

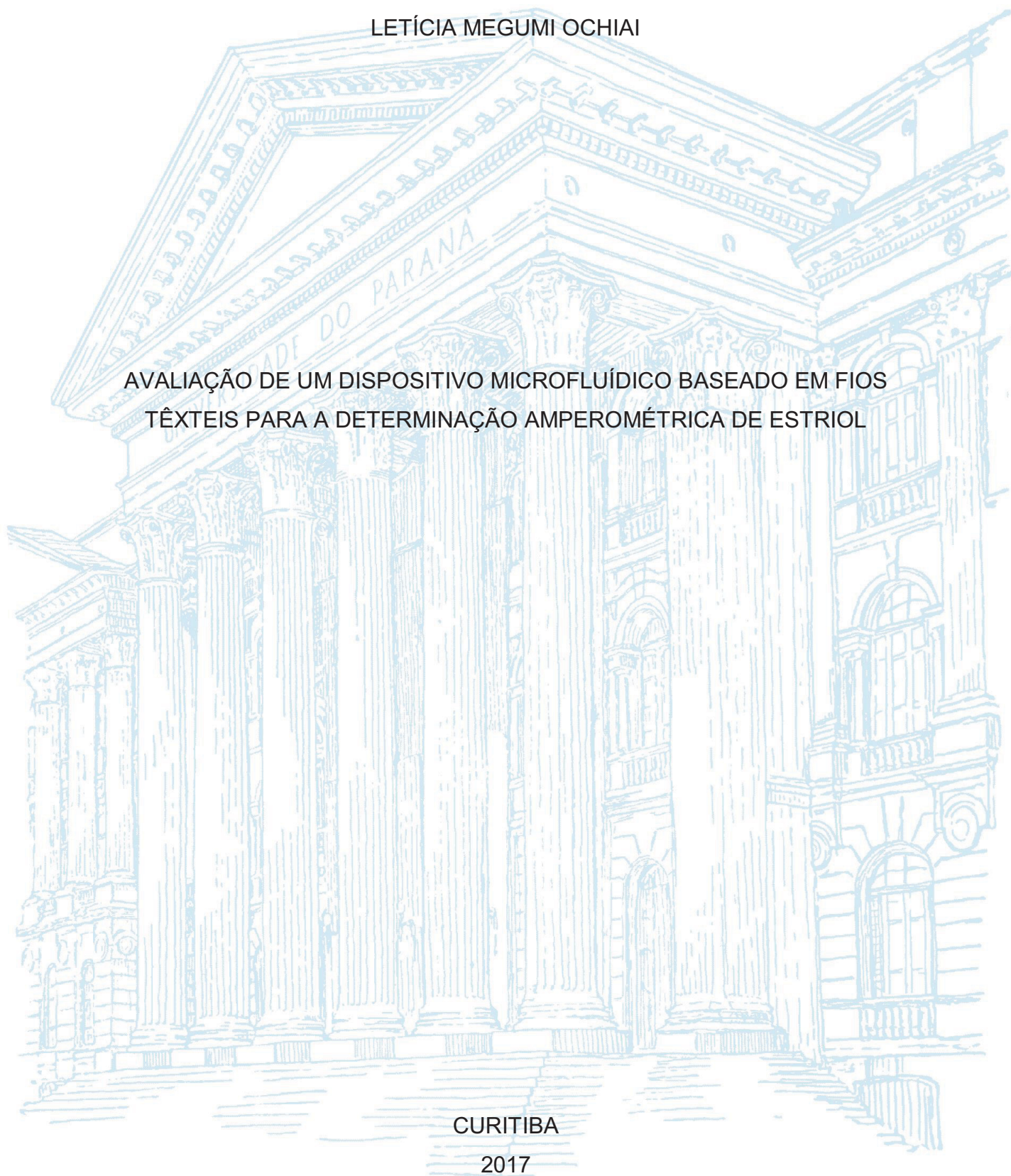
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA MEGUMI OCHIAI

AVALIAÇÃO DE UM DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO BASEADO EM FIOS
TÊXTEIS PARA A DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE ESTRIOL

CURITIBA

2017



LETÍCIA MEGUMI OCHIAI

AVALIAÇÃO DE UM DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO BASEADO EM FIOS
TÊXTEIS PARA A DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE ESTRÍOL

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Júnior

CURITIBA

2017

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

O16a

Ochiai, Leticia Megumi

Avaliação de um dispositivo microfluídico baseado em fios têxteis para a determinação amperométrica de estriol / Leticia Megumi Ochiai. – Curitiba, 2018.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.

Orientador: Márcio Fernando Bergamini. - Coorientador: Luiz Humberto Marcolino Júnior.

1. Análise por injeção de fluxo. 2. Fios de algodão. 3. Nanotubos de carbono. I. Universidade Federal do Paraná. II. Bergamini, Márcio Fernando. III. Marcolino Júnior, Luiz Humberto. VI. Título.

CDD: 547.28

Bibliotecária: Vanusa Maciel - CRB - 9/1928

TERMO DE APROVAÇÃO

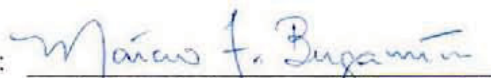
**AVALIAÇÃO DE UM DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO BASEADO EM
FIOS TÊXTEIS PARA DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE
ESTRIOL**

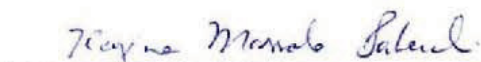
por


LETÍCIA MEGUMI OCHIAI

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:


Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini
Dep. de Química – UFPR


Prof.ª Dr.ª Regina Massako Takeuchi
Dep. de Química – UFU


Prof. Dr. Gilberto Abate
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 23 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu Deus por ter me sustentado e me trazido até aqui, sendo que sem a ajuda dEle eu jamais estaria onde estou hoje. Por sempre me ajudar a ir além e por ser a minha força, obrigada Deus!

Ao professor Márcio Fernando Bergamini, pela orientação, paciência, instrução, atenção e dedicação durante todo o processo de desenvolvimento do presente trabalho. Por me ajudar a encontrar a pesquisadora que há dentro de mim, muito obrigada.

Ao professor Luiz Humberto Marcolino Jr. pela orientação, conselhos, dicas, contribuições, piadas e afins que me ajudaram durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Gilberto Abate e Noemi Nagata pelas contribuições e dicas dadas durante o exame de qualificação. À professora Regina Massako Takeuchi e novamente ao professor Gilberto Abate pela participação e contribuições nesta banca.

Ao Deonir pela disponibilidade e pela atenção em me ajudar com o desenvolvimento do dispositivo e pela ajuda com as análises de microscopia.

Ao CNPq e a Capes pela suporte financeiro durante o esse projeto.

Aos meus pais, Kazumi e Julio, por terem feito de tudo para que eu pudesse ter condições de chegar até aqui e por terem se sacrificado tanto para que eu pudesse concluir mais essa etapa na minha vida. Amo vocês!

Ao Rodrigo por sempre me ouvir, me aconselhar, me corrigir quando necessário, me dando forças para continuar e não desistir. Por todos os dias que passei e vou passar ao seu lado, sabendo que mesmo que tudo dê errado, você sempre vai estar lá para me animar e me fazer acreditar em mim mesma.

À minha família, por sempre acreditarem em mim e por me incentivarem a ir em frente sempre. Pelos almoços, risadas, companheirismo que me ajudaram a continuar, muito obrigada!

Às melhores amigas e irmãs de coração do mundo Akemi e Patrícia, pelos longos anos de amizade. Agradeço por serem um grande exemplo para mim, por sempre estarem lá quando preciso, por sempre rirem das minhas piadas sem sentido, pelas risadas, choros, desabafos, por me ajudarem a ser

uma pessoa melhor e por saber que não importa o quão longe estejamos, sempre vamos estar lá quando a outra precisar!

Aos meus grandes amigos Priscila, Rebeca, Mamoru, Felipe, Yoshiharu, Tsuyoshi e Márcia Funai por todos os papos sérios, pelas risadas, pelas besteiras ditas, pelas orações, pelo apoio, pela eterna parceria e amizade, obrigada!

Aos meus colegas do LabSensE: Amanda, Ava, Michelle, Bárbara, Priscilla, Eduardo, Jeferson, Gustavo, Emmanuelle, Maurício, Deonir, Emily, Carol, Paulo, Geovani agradeço de coração por me ajudarem sempre, pelos conselhos e pela amizade.

Aos meus amigos, companheiros de luta, Gustavo, Rafael, Ana Luiza, Mariana de Oliveira, Mariana Lopes, Jéssica, João, Ronaldo e Helen pelos cinco anos de graduação que enfrentamos juntos. Não poderia ter tido amigos de guerra melhores. Vai GRR2010!

A todos que de alguma forma me ajudaram a chegar onde estou, muito obrigada!

RESUMO

Sistemas microfluídicos são dispositivos que se baseiam em princípios similares aos de sistemas de análise por injeção em fluxo. Esses dispositivos permitem o baixo consumo de reagentes e amostras, o baixo tempo de análise e a possibilidade de portabilidade. Diversos avanços têm sido relatados ao utilizar dispositivos de baixo custo baseados em fios de algodão como canais microfluídicos, em que o transporte da solução ocorre devido à capilaridade dos fios de algodão, com auxílio da gravidade. No presente trabalho, foi demonstrado a versatilidade de um dispositivo eletroanalítico baseado em fios têxteis (μ TED), construídos utilizando fios de algodão como microcanais para o transporte de solução e eletrodos impressos (SPE) modificados com nanotubos de carbono (CNT), como detectores na determinação amperométrica do hormônio estriol em amostras farmacêuticas e aquosas. Os parâmetros envolvidos na determinação amperométrica e no sistema microfluídico foram estudados e otimizados, em que se utilizou das condições experimentais que apresentaram melhores respostas (vazão do sistema de $1,25 \mu\text{L s}^{-1}$, $2,0 \mu\text{L}$ de volume de injeção e potencial de detecção de $0,75 \text{ V}$) para a obtenção de uma curva analítica, abrangendo concentrações de $1,0$ a $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram $0,53$ e $1,77 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, e a frequência analítica foi de 44 injeções por hora. A metodologia proposta foi aplicada para a determinação do hormônio estriol em amostras farmacêuticas, sendo os resultados obtidos comparados com os obtidos a partir da técnica espectrofotométrica (metodologia oficial). Os resultados obtidos foram concordantes com 95 % de confiança.

Palavras – chave: Sistemas microfluídicos, dispositivo baseado em fios de algodão, determinação de hormônios, eletrodos impressos, nanotubos de carbono.

ABSTRACT

Microflow systems are powerful analytical tools that explore similar principles of typical flow injection analysis driven to in a microfluidic device. Generally, microfluidic devices can promote a low consumption of reagents and samples, high speed of analysis and possibility of portability. Several advances have been reached applying a simple and low cost device based on cotton thread as microfluidic channel where the transportation of solutions is based on capillary force helped by gravity. In the present work, we have demonstrated the versatility of thread-based electroanalytical devices (μ TED) constructed using a cotton thread as the solution channel and screen-printed electrodes (SPE) surface modified with carbon nanotubes (CNT) as electrochemical detectors for the amperometric determination of estriol hormone in pharmaceutical samples. The parameters involved in the amperometric detection and microflow system were studied and optimized, using the best experimental conditions (flow rate of $1.25 \mu\text{L s}^{-1}$, $2.0 \mu\text{L}$ of volume of injection and potential of detection of 0.75 V) a linear response was observed for concentration range (LDR) of 1.0 to $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ with limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of $0.53 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $1.77 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively, and sampling rate of 44 analyses/ per hour. The proposed methodology was applied for determination of estriol in commercial samples. The results were compared with those provided by spectrophotometric method (official methodology). The obtained results are in agreement at a 95% of confidence level.

Keywords: Microfluidic systems, thread-based electroanalytical device, hormone determination, screen printed electrodes, carbon nanotubes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Dispositivo microfluídico desenvolvido para o monitoramento do crescimento bacteriano. Os canais microfluídicos estão indicado pelas linhas coloridas. O dispositivo apresenta uma alta densidade de válvulas pneumáticas, visando o bombeamento de fluidos pelo dispositivo..... 15
- Figura 2. Dispositivo microfluídico desenvolvido a partir de materiais de baixo custo, visando à realização de imunoensaios sanduíche 16
- Figura 3. Dispositivo colorimétrico baseado em papel para de determinação de glicose e proteínas em atletas; (A) Entrada do dispositivo é colocada sobre amostra de urina; (B) Amostra é arrastada para zonas de detecção por capilaridade 17
- Figura 4. Dispositivo colorimétrico baseado em fios de algodão para de determinação qualitativa de proteínas, nitritos e cetonas em urina artificial. (A) Entrada do dispositivo é colocada sobre amostra de urina; (B) Amostra é arrastada para zonas de detecção por capilaridade 18
- Figura 5. Dispositivo eletroquímico baseado em fios de algodão para de determinação acetaminofeno e diclofenaco. (A) Ilustração da configuração do dispositivo eletroquímico e suas principais dimensões: comprimento (90 mm), largura (25 mm) e diferença de altura entre os reservatórios de entrada e saída (26 mm); (B) Amperograma de múltiplos pulsos obtido para as amostras de fármacos 19
- Figura 6. (A) Aplicação de potencial em um experimento amperométrico, sem agitação, sendo E_1 referente ao potencial em que o analito é eletroinativo, mas é oxidado/reduzido em E_2 ; (B) Gráfico de corrente por tempo 21
- Figura 7. Representação de eletrodos impressos. (A) Eletrodo de trabalho; (B) contra eletrodo; (C) eletrodo de referência; (D) camada isolante; (E) substrato; (F) caminhos condutores 23
- Figura 8. Representação esquemática da fabricação de eletrodos impressos comumente utilizada. (A) Molde é posicionado sobre a superfície do substrato; (B) Tinta condutora é colocada sobre o molde, sendo espalhada com o auxílio de um stencil ou rolo; (C) Após a secagem da tinta, o molde é retirado, sendo obtidos os eletrodos; (D) Finalmente, realiza-se uma etapa de cura da tinta impressa sobre o substrato 24
- Figura 9. Ilustração representativa de nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT) e paredes múltiplas (MWCNT)..... 27

Figura 10. Representação esquemática da oxidação química de nanotubos de carbono.....	28
Figura 11. Estruturas químicas dos hormônios estrógenos (A) 17- β -estradiol, (B) estriol, (C) estrona e (D) progesterona	30
Figura 12. Representação esquemática da ação tóxica dos estrógenos sobre os mecanismos de controle do sistema endócrino.	31
Figura 13. Esquema de construção do dispositivo microfluídico, com as etapas de construção representadas pelos números 1 a 6	39
Figura 14. Fotografias do μ TED após processo de construção	39
Figura 15. Representação do SPCE utilizado neste trabalho	41
Figura 16. Espectro na região do infravermelho dos CNTs tratados utilizados na modificação do eletrodo de trabalho	43
Figura 17. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) dos CNTs utilizados na modificação do eletrodo de trabalho	44
Figura 18. Espectro Raman dos nanotubos de carbono funcionalizados utilizados na modificação dos eletrodos impressos	45
Figura 19. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da superfície dos SPCE não modificados (A) e modificados (B) com CNT	46
Figura 20. Voltamogramas cíclicos comparativos utilizando o GCE e o GCE/CNT como eletrodos de trabalho. Os voltamogramas foram obtidos na presença de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ de estriol, em solução de tampão acetato e etanol 0,25 mol L ⁻¹ (1:1) em pH 5,0. Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹	47
Figura 21. Esquema da reação de oxidação do estriol.....	47
Figura 22. Voltamogramas cíclicos consecutivos obtidos na presença de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ de estriol, em solução de tampão acetato e etanol 0,25 mol L ⁻¹ (1:1) em pH 5,0. Utilizando (A) GCE e (B) GCE/CNT como eletrodos de trabalho. Velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	48
Figura 23. Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de $1,0 \times 10^{-3}$ de estriol, em solução de tampão acetato e etanol 0,25 mol L ⁻¹ (1:1) em pH 5,0, variando de 5 – 100 mVs ⁻¹ . GCE/CNT foi utilizado como eletrodo de trabalho. Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹	50
Figura 24. Influência do pH nos valores de potencial de oxidação do estriol (A) e pico de corrente (B) na presença de estriol $5,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ (n = 3) em solução de tampão acetato 0,50 mol L ⁻¹ e etanol (1:1) em pH 5,0. GCE/CNT foi utilizado como eletrodo de trabalho. Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹	51

Figura 25. Voltamogramas cíclicos comparativos utilizando o SPCE e o SPCE/CNT como eletrodos de trabalho. Os voltamogramas foram obtidos na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de estriol, em solução de acetato e etanol 0,25 mol L^{-1} (1:1) em pH 3,0. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}	52
Figura 26. Relação entre volume de solução que flui pelo μTED em função do tempo ($n = 3$). O coeficiente angular representa a vazão da solução e o R^2 é o coeficiente de determinação	53
Figura 27. Resposta amperométrica (●) e frequência analítica (▲) em função do volume de injeção de estriol utilizando SPCE/CNT. Respostas obtidas injetando alíquotas de solução $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de estriol, utilizando solução de acetato e etanol 0,25 mol L^{-1} (1:1) em pH 3,0 como eletrólito suporte ($n = 3$). $E_{\text{aplicado}} = 0,75 \text{ V}$	54
Figura 28. (A) Variação dos valores de corrente de pico obtidos a partir de amperogramas gerados utilizando o μTED , aplicando-se potenciais que variaram de 0,60 – 0,90 V. Cada ponto representa a resposta média para 10 adições consecutivas. (B) Respostas amperométricas obtidas referentes às injeções de alíquotas de 2,0 μL de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de estriol, variando-se o potencial de 0,60 a 0,90 V, com uma vazão de $1,25 \mu\text{L s}^{-1}$	55
Figura 29. Respostas amperométricas relativas obtidas utilizando o μTED , utilizando uma mesma superfície (A) e diferentes superfícies (B). Respostas referentes às injeções de alíquotas de 2,0 μL de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de estriol, com uma vazão de $1,25 \mu\text{L s}^{-1}$. Potencial aplicado: 0,75 V	56
Figura 30. Sucessivas respostas amperométricas obtidas utilizando o μTED referentes às injeções de alíquotas de 2,0 μL de soluções padrão de estriol, variando de (a) 1,0; (b) 5,0; (c) 10,0; (d) 50,0; (e) 100,0; (f) 500,0 e (g) 1000,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com uma vazão de $1,25 \mu\text{L s}^{-1}$. Potencial aplicado: 0,75 V. Curva analítica referente às respostas amperométricas obtidas utilizando o μTED (a direita superior). Cada ponto é o valor médio entre 6 injeções para cada concentração	57
Figura 31. Curvas analíticas referentes às injeções no sentido direto (concentrações menores para as maiores) e sentido inverso (concentrações maiores para as menores)	58
Figura 32. Sucessivas respostas amperométricas obtidas utilizando o μTED referentes às injeções de alíquotas de 2,0 μL de soluções padrão de estriol, variando de (a) 10,0; (b) 50,0; (c) 100,0; (d) 200,0 e (e) 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e duas amostras farmacêuticas (S_1 e S_2), com uma vazão de $1,25 \mu\text{L s}^{-1}$. Potencial aplicado: 0,75 V. A curva analítica obtida em detalhe	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de decaimento de corrente referente ao estudo de envenenamento da superfície dos eletrodos GCE e GCE/CNT.	49
Tabela 2. Características gerais dos métodos eletroquímicos utilizados para a determinação de estriol.	59
Tabela 3. Valores de concentração de estriol obtidos a partir do método espectrofotométrico comparativo.	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACT: Acetaminofeno

BDDE: Eletrodo de diamante dopado com boro (do inglês: boron-doped diamond electrode)

BIA: Sistema de injeção em batelada (do inglês: Batch Injection Analysis)

CNT: Nanotubos de carbono (do inglês: carbon nanotubes)

DCF: Diclofenaco

DPV: voltametria de pulso diferencial (do inglês: differential pulse voltammetry)

FIA: Sistema de injeção em fluxo (do inglês: Flow Injection Analysis)

GC: Cromatografia a gas (do inglês: Gas Chromatography)

GCE/CNT: Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono

GCE/Lac/rGO/Sb₂O₅: Eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de óxido de antimônio (Sb₂O₅) dopado com óxido de grafeno reduzido com enzima lacase imobilizada

GCE/Pt/MWCNTs: Eletrodo modificado com compósito de nanoclusters de platina e nanotubos de carbono de paredes múltiplas.

GCE/rGO–SbNPs: Eletrodo de carbono vítreo modificado com compósito de óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de antimônio

GCE: Eletrodo de carbono vítreo (do inglês: glassy carbon electrode)

LC: Cromatografia líquida de alta pressão (do inglês: Liquid Chromatography)

LOD: Limite de detecção

LOD: Limite de quantificação

LDR: região linear (do inglês: linear dynamic range)

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MIP: Polímero molecularmente impresso (do inglês: Molecularly Imprinted Polymer)

MWCNT: Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês: multi-wall carbon nanotubes)

SD: desvio padrão (do inglês: standard deviation)

SIA: Sistema de injeção sequencial (do inglês: Sequential Injection Analysis)

SPCE: Eletrodo impresso de carbono (do inglês: screen printed carbon electrode)

SPCE/CNT: Eletrodo impresso de carbono modificado com nanotubos de carbono

SPCE/MWCNT: Eletrodo impresso de carbono modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas

SPE: Eletrodo impresso (do inglês: screen printed electrode)

SWCNT: Nanotubos de carbono de parede simples (do inglês: single-wall carbon nanotubes)

SWV: voltametria de onda quadrada (do inglês: square wave voltammetry)

μ PAD: Sistemas microfluídicos baseados em papel (do inglês: Paper-based Analytical Device)

μ TAD: Sistemas microfluídicos baseados em fios têxteis (do inglês: Thread-based Analytical Device)

μ TAS: Sistemas de microanálise total (do inglês: Total Microanalysis System)

μ TED: Sistemas microfluídicos eletroquímicos baseados em fios têxteis (do inglês: Thread-based Electrochemical Device)

SUMÁRIO

1.1 SISTEMAS MICROFLUÍDICOS	14
1.2 DETERMINAÇÕES ELETROANALÍTICAS	19
1.2.1 Técnicas Eletroanalíticas	19
1.2.2 Eletrodos Impressos	23
1.2.3 Nanomateriais	25
1.3 HORMÔNIOS	29
1.3.1 Estriol	31
2 OBJETIVOS	34
2.1 OBJETIVO GERAL	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	35
3.2 FABRICAÇÃO DOS ELETRODOS IMPRESSOS DE CARBONO (SPCE)	36
3.3 FUNCIONALIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO (CNTs)	36
3.4 MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS IMPRESSOS DE CARBONO (SPCE)	37
3.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ELETRODOS IMPRESSOS E NANOTUBOS DE CARBONO	37
3.6 CONSTRUÇÃO DO DISPOSITIVO ELETROQUÍMICO BASEADO EM FIOS TÊXTEIS (μ TED)	38
3.7 AVALIAÇÃO DA VAZÃO DO DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO	40
3.8 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA E PROCEDIMENTO ANALÍTICO	40
3.9 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA FARMACÊUTICA	41
3.10 MÉTODO COMPARATIVO: ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ELETRODOS IMPRESSOS	43
4.2 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO ESTRIOL	46
4.3 DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO UTILIZANDO μ TED COM ELETRODO IMPRESSO DE CARBONO MODIFICADO	52

4.4 ANÁLISE DA AMOSTRA FARMACÊUTICA	59
5 CONCLUSÃO	62
6 REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMAS MICROFLUÍDICOS

Os sistemas microfluídicos são sistemas em que são processadas ou manipuladas pequenas quantidades de fluidos, na ordem de nanolitros, utilizando canais de dimensões que vão de dezenas a centenas de micrômetros [1]. Desde o seu desenvolvimento na década de 1970 [2], a fabricação de sistemas dessa natureza teve diferentes influências como o desenvolvimento de métodos microanalíticos (cromatografia de fase gasosa (GC), cromatografia líquida (LC) e eletroforese capilar), o desenvolvimento da microeletrônica, a necessidade de sistemas portáteis para a determinação de ameaças químicas e biológicas, entre outros [1]. Vários estudos utilizando sistemas microfluídicos têm sido propostos, mostrando a aplicabilidade deste tipo de sistema [3-11].

As diferenças fundamentais entre os sistemas convencionais e os microfluídicos têm sido objeto de estudos na literatura. Janasek *et al.* [12] relacionaram a diferença do transporte de fluidos em sistemas macroscópicos e microfluídicos, sendo a maior diferença a turbulência dos fluidos, sofrida apenas para sistemas macroscópicos, devido a presença de ar. Em sistemas microfluídicos, devido às dimensões miniaturizadas, o fluxo ocorre em paralelo, sem turbulência, sendo esse fenômeno denominado fluxo laminar [1, 12]. Em microssistemas, a mistura desses fluidos não ocorre devido a forças convectivas, mas ocorre pela difusão de moléculas pela interface entre os fluidos [12].

Sistemas dessa natureza têm sido conhecidos como sistemas de microanálise total (μ TAS), em que há a passagem de um fluxo contínuo da solução carregadora, resultando no arraste das amostras até as zonas de detecção, o que permite a quantificação de diferentes compostos [2]. Estes sistemas têm sido fabricados com materiais como silicone/vidro, elastômeros, hidrogéis, papel e outros materiais [2,13]. Os μ TAS têm sido aplicados nas mais variadas áreas, como as de síntese química, análise biológica e pesquisa médica, e têm apresentado grande potencial devido às suas características como a miniaturização, portabilidade, baixo consumo de amostras e reagentes, detecção com alta resolução e sensibilidade, e baixo tempo de análise [12,14-15]. Apesar das vantagens apresentadas por esses sistemas, a tecnologia de sistemas

microfluídicos ainda tem sido pouco utilizada, devido ao fato de ser uma ciência que ainda se encontra nos estágios iniciais de desenvolvimento [1].

Balagaddé e colaboradores [16] relataram o desenvolvimento de um biorreator microfluídico, visando o monitoramento do crescimento de pequenas populações de bactérias, como a *Escherichia coli*. A Figura 1 ilustra as pequenas dimensões do dispositivo desenvolvido, o qual utiliza um sistema miniaturizado de bombeamento de fluidos.

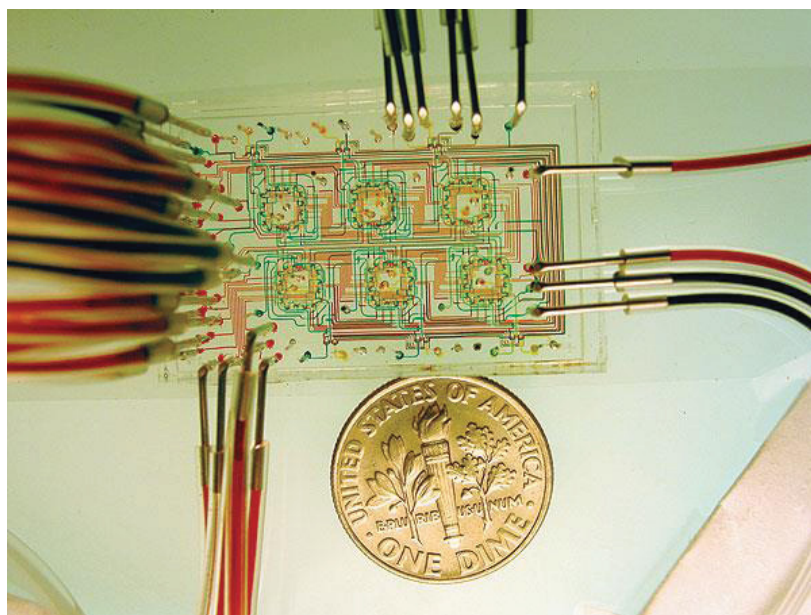


Figura 1. Dispositivo microfluídico desenvolvido para o monitoramento do crescimento bacteriano. Os canais microfluídicos estão indicado pelas linhas coloridas. O dispositivo apresenta uma alta densidade de válvulas pneumáticas, visando o bombeamento de fluidos pelo dispositivo. FONTE: Balagaddé, *et al.* [16]

Weibel e colaboradores [17] desenvolveram um dispositivo que propicia a realização de imunoensaios do tipo sanduíche, muito utilizados na medicina e em pesquisas biológicas. O dispositivo foi feito utilizando materiais de baixo custo e de fácil manuseio e pode ser visualizado na Figura 2. Os parafusos, indicados pelas linhas tracejadas, foram utilizados como válvulas de bombeamento e os canais microfluídicos estão indicados em verde.

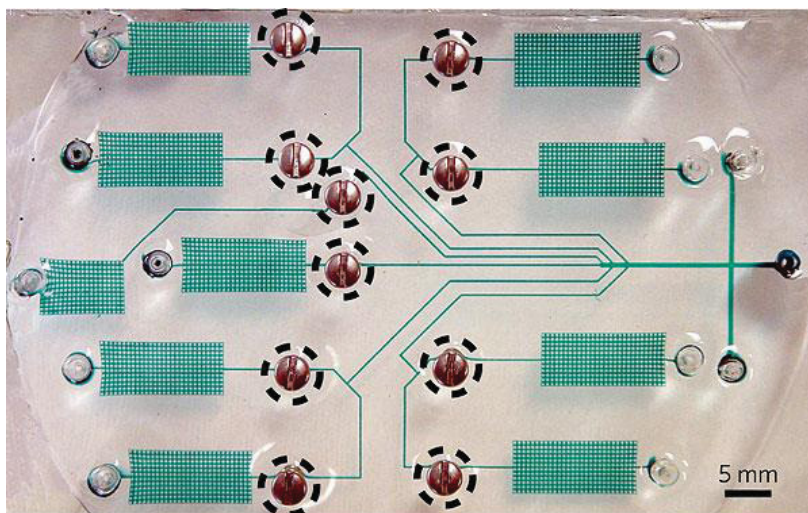


Figura 2. Dispositivo microfluídico desenvolvido a partir de materiais de baixo custo, visando à realização de imunoenaios sanduíche. FONTE: Weibel, *et al.* [17].

Apesar das vantagens apresentadas por esses sistemas miniaturizados convencionais, como miniaturização e portabilidade, algumas desvantagens como o custo elevado de produção, processos de fabricação complexos, necessidade de equipamentos externos para realizar o bombeamento das soluções têm resultado na utilização de materiais alternativos para a construção destes dispositivos microfluídicos, como o papel [18-20].

Estudos envolvendo o uso de dispositivos analíticos baseados em papel (μ PAD) têm sido reportados por diversos autores devido a sua versatilidade, abundante disponibilidade e possibilidade de descarte [15,21-23]. Martinez e colaboradores [22] relataram o desenvolvimento de um dispositivo colorimétrico baseado em papel utilizado para a determinação de glicose e proteínas em urina, sendo o dispositivo desenvolvido ilustrado na Figura 3.

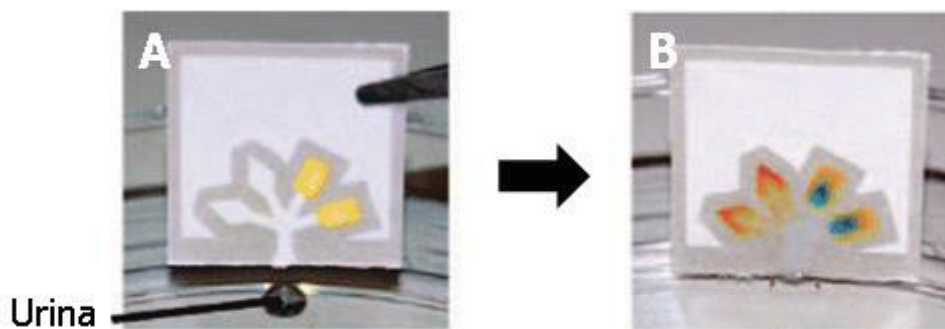


Figura 3. Dispositivo colorimétrico baseado em papel para de determinação de glicose e proteínas em atletas; (A) Entrada do dispositivo é colocada sobre amostra de urina; (B) Amostra é arrastada para zonas de detecção por capilaridade. FONTE: (Adaptado) Martinez, *et al.* [22].

Segundo os autores, o intuito desse dispositivo era permitir a verificação do estado de saúde de atletas, através da determinação destes compostos, em que os dados seriam coletados por câmeras de telefone ou scanners portáteis e enviados digitalmente a um laboratório para posterior análise, sendo os resultados obtidos enviados para o responsável de saúde do local em que análise foi feita. As intensidades de cores desenvolvidas para cada amostra foram comparadas com as obtidas em curvas analíticas feitas previamente [22].

Entretanto, há algumas limitações relacionadas ao uso destes μ PADs, como a baixa eficiência no arraste da amostra, baixa resistência mecânica quando utiliza-se o papel molhado, a necessidade da construção de barreiras hidrofóbicas (consequentemente, um processo extra de fabricação para obtenção dos canais) e o vazamento das amostras com baixa tensão superficial pelos canais [24].

Nesse contexto, um material alternativo ao papel apresentado na literatura são os fios têxteis com destaque para os de algodão, resultando na fabricação de dispositivos analíticos baseados em fios têxteis (μ TAD). Os μ TADs apresentam vantagens em comparação com dispositivos baseados em outros materiais, como o papel. As vantagens desses μ TADs incluem: (1) definição das regiões hidrofóbicas e hidrofílicas é desnecessária; (2) o caminho percorrido pela amostra pode ser facilmente trocado; (3) maior resistência mecânica e flexibilidade; (4) controle preciso dos volumes de amostra não é necessário; (5) diferentes materiais fibrosos e combinações podem ser utilizados visando aplicação em diferentes tipos de dispositivo portáteis [25-26].

Para esses sistemas microfluídicos, diferentes técnicas são utilizadas para o sistema de detecção, como colorimetria e quimiluminescência [27]. Dentre as técnicas utilizadas para o sistema de detecção, as técnicas eletroquímicas têm sido amplamente utilizadas para a fabricação de dispositivos microfluídicos, principalmente devido às suas características como alta sensibilidade, baixo custo, baixa necessidade energética, interface eletrônica direta, uso de detectores simples e pequenos, compatibilidade com a tecnologia de microfabricação [26,28-30].

A miniaturização de dispositivos é possível devido à detecção eletroquímica ser baseada em reações redox ocorrendo na superfície do eletrodo, não dependendo de um comprimento do caminho ótico, resultando em um sistema miniaturizado sem a perda de sensibilidade [29]. Um dos dispositivos baseados em fios têxteis, como os fios de algodão, apresentados na literatura é descrito por Reches *et al* [31], em que os autores utilizaram um μ TAD para a análise colorimétrica qualitativa de compostos como cetonas, nitritos, proteínas, em urina artificial e fosfatase alcalina em plasma artificial, sendo um esquema do dispositivo utilizado apresentado na Figura 4.

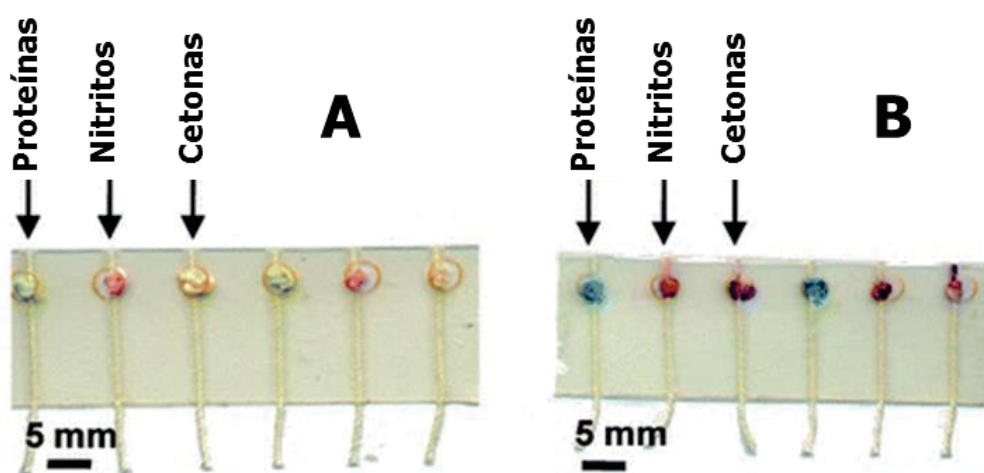


Figura 4. Dispositivo colorimétrico baseado em fios de algodão para de determinação qualitativa de proteínas, nitritos e cetonas em urina artificial. (A) Entrada do dispositivo é colocada sobre amostra de urina; (B) Amostra é arrastada para zonas de detecção por capilaridade. FONTE: (Adaptado) Reches, *et al.* [31].

Além dos μ TADs, há também os dispositivos eletroanalíticos baseados em fios têxteis (μ TEDs), que se utilizam de técnicas eletroanalíticas como formas

de detecção. Recentemente, Agustini e colaboradores [32] reportaram a construção de um dispositivo microfluídico eletroanalítico (μ TED) de baixo custo, em que os canais microfluídicos foram obtidos a partir de fios de algodão, visando à obtenção de um dispositivo para a determinação amperométrica simultânea de acetaminofeno (ACT) e diclofenaco (DCF). A Figura 5 ilustra o dispositivo desenvolvido, com alguns resultados apresentados pelos autores. A faixa linear obtida foi entre 10 e 320 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para ambos os analitos e o limites de detecção e de quantificação de 1,4 e 4,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 2,5 e 8,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para ACT e DCF, respectivamente.

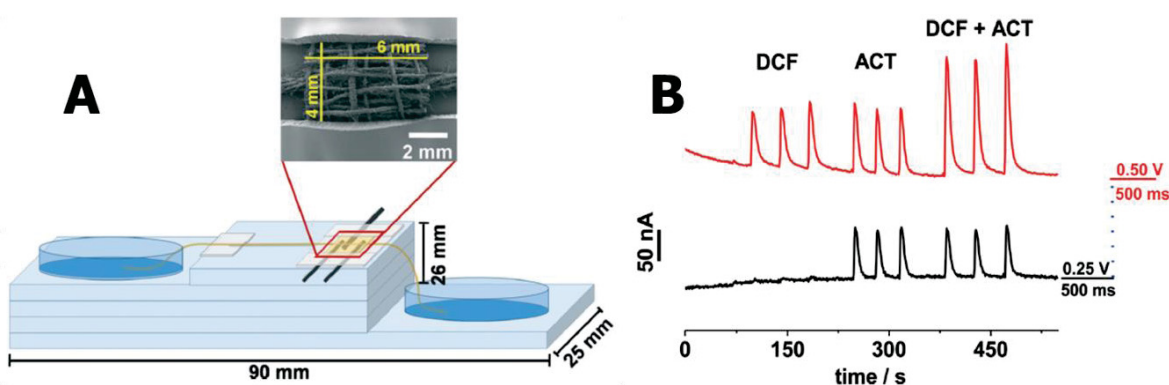


Figura 5. Dispositivo eletroquímico baseado em fios de algodão para de determinação acetaminofeno e diclofenaco. (A) Ilustração da configuração do dispositivo eletroquímico e suas principais dimensões: comprimento (90 mm), largura (25 mm) e diferença de altura entre os reservatórios de entrada e saída (26 mm); (B) Amperograma de múltiplos pulsos obtido para as amostras de fármacos. FONTE: (Adaptado) Agustini, *et al.* [32].

1.2 DETERMINAÇÕES ELETROANALÍTICAS

1.2.1 Técnicas Eletroanalíticas

As técnicas eletroanalíticas são um conjunto de técnicas que relacionam propriedades elétricas mensuráveis como corrente elétrica, diferença de potencial elétrico, condutividade, etc, com a concentração de uma espécie de interesse. Essas propriedades elétricas são observadas a partir da interação física e/ou química de uma espécie com os demais componentes do meio, ou mesmo interfaces [33]. Dentro deste contexto, a voltametria e amperometria têm sido

amplamente aplicadas no monitoramento ambiental, no controle de qualidade de produtos e em processos industriais e em análises biomédicas [33].

Voltametrias são técnicas baseadas na medida de uma corrente elétrica, em função do potencial aplicado sobre o eletrodo de trabalho, em que se utilizam condições que favoreçam a polarização do eletrodo [34]. A voltametria é baseada nos fenômenos que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho, sendo considerada uma técnica dinâmica, visto que há a passagem de corrente elétrica [33].

O potencial aplicado ao eletrodo de trabalho varia sistematicamente, podendo ser representado por várias funções voltagem-tempo: varredura linear, cíclica ou pulsada (normal, diferencial e onda quadrada) [34-36]. Na voltametria cíclica, o potencial aplicado varia linearmente com o tempo, em um eletrodo de trabalho estacionário, em uma solução em repouso, sendo o potencial aplicado no sentido direto e no sentido reverso, para a obtenção de um ciclo voltamétrico. A voltametria cíclica é uma técnica eletroanalítica amplamente empregada e, embora não seja utilizada com frequência na análise quantitativa, ela encontra ampla aplicabilidade em estudos qualitativos como o estudo da termodinâmica de reações redox, na detecção de intermediários de reação, e na observação e no acompanhamento de reações químicas acopladas a processos adsorptivos [33-34].

A amperometria é uma técnica eletroquímica em que um potencial elétrico constante é aplicado sobre o eletrodo de trabalho, sendo que esse potencial aplicado deve ser suficiente para promover a oxidação ou redução de espécies eletroativas presentes na célula eletroquímica [37-39]. A magnitude da corrente resultante da oxidação/redução do analito na superfície do eletrodo é dependente da concentração do analito, permitindo com que a amperometria seja utilizada em diversas aplicações analíticas. Utilizando essa técnica, é possível distinguir diferentes espécies eletroativas em solução, variando-se condições experimentais como potencial elétrico aplicado, material do eletrodo de trabalho, tipo de eletrólito suporte, etc [39-40].

A Figura 6A mostra um esquema de aplicação de potencial em um experimento amperométrico, sem agitação, podendo ser aplicado ou não um potencial E_1 em que não ocorre nenhuma reação faradaica. A aplicação do potencial E_2 promove a oxidação/redução da espécie eletroativa, sendo a corrente

observada na Figura 6B limitada pelo gradiente de concentração dessa espécie na superfície do eletrodo.

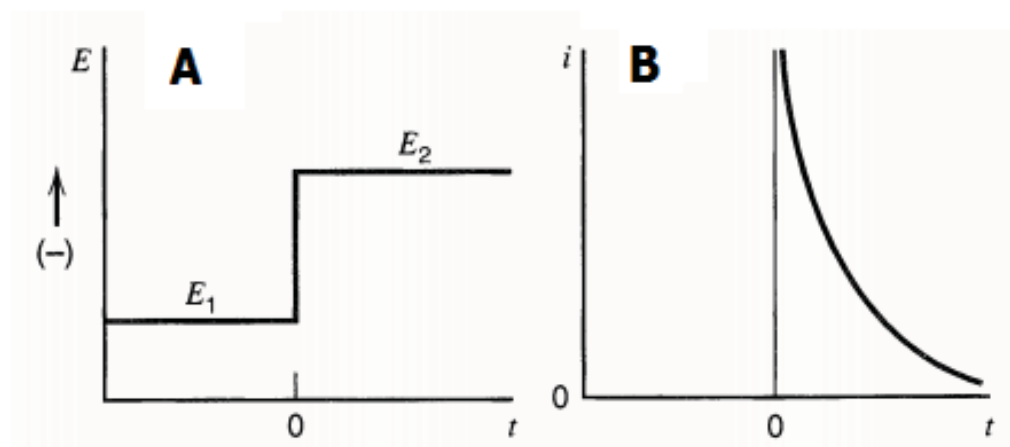


Figura 6. (A) Aplicação de potencial em um experimento amperométrico, sem agitação, sendo E_1 referente ao potencial em que o analito é eletroinativo, mas é oxidado/reduzido em E_2 ; (B) Gráfico de corrente por tempo. FONTE: (Adaptado) Bard, *et al.* [36].

As vantagens das técnicas amperométricas incluem a possibilidade de miniaturização dos eletrodos e o uso de instrumentação simples, quando comparada com outras técnicas como espectrometria de massas, absorvância UV-Vis, etc, sendo que essa simplicidade instrumental permite a possibilidade de integração do sensor em um dispositivo portátil [37].

A adequação de dispositivos que funcionam em condições amperométricas, em sistemas com fluxo de solução, tem sido amplamente empregada para determinação de diversos analitos. Nesses casos, a detecção eletroquímica é baseada no transporte de espécies eletroativas da solução para a superfície de um eletrodo, sendo que esse detector responde a presença de espécies próximas a sua superfície [41]. De modo a facilitar o transporte dessas espécies eletroativas, uma alternativa tem sido o uso de sistemas hidrodinâmicos, como os sistemas de análise por injeção em batelada (BIA), sequencial (SIA) e em fluxo (FIA) [42].

Devido ao fluxo constante de solução, esses sistemas apresentam uma maior sensibilidade [42-43] em comparação aos sistemas convencionais sem agitação. Sistemas amperométricos em fluxo também apresentam menores efeitos de contaminação da superfície do eletrodo de trabalho, devido ao tempo reduzido de contato da amostra e dos produtos do processo redox com o eletrodo

e à limpeza constante realizada na superfície do eletrodo pela passagem contínua da solução carregadora [43].

Outra vantagem de sistemas dessa natureza é a presença de corrente capacitiva negligenciável logo após o início do experimento, visto que se aplica um único potencial durante o processo, o que favorece medições de menores correntes faradaicas e, conseqüentemente, menores concentrações [43]. Além disso, esses tipos de sistemas permitem alta precisão e frequência analítica, boa reprodutibilidade, redução do risco de contaminação durante a etapa de análise, baixo custo de instrumentação [42,44-45]. O uso da detecção amperométrica em fluxo tem apresentado resultados satisfatórios por diferentes autores na literatura [42, 46-50].

A detecção amperométrica é controlada pela aplicação de um potencial controlado no eletrodo de trabalho, sendo neste eletrodo onde ocorrem as reações redox de interesse. A corrente elétrica medida gera um sinal analítico útil, utilizado para a quantificação do analito. Uma limitação observada para esse tipo de técnica é a estabilidade do sinal eletroquímico em função do tempo quando se analisa determinados compostos, podendo comprometer a repetibilidade da resposta analítica e a reprodutibilidade dos resultados. Para compostos como, por exemplo, fenóis e hormônios [51-54], há a possibilidade que uma espécie eletroativa e/ou produto das reações redox adsorvam na superfície do eletrodo, podendo ser de modo irreversível (ou quase reversível), resultando na contaminação e/ou passivação do eletrodo [42-43].

Os sensores eletroquímicos mais utilizados em conjunto com as técnicas amperométricas em fluxo visando à determinação de hormônios incluem eletrodos de trabalho de ouro, platina e carbono (pasta de carbono, carbono vítreo, etc), sendo utilizado um sistema convencional de três eletrodos [55-56]. Entretanto, o uso desses eletrodos requerem etapas de polimento da superfície do eletrodo, decorrente da susceptibilidade destes ao envenenamento da sua superfície devido à adsorção dos produtos dos processos redox [55].

Ainda, a necessidade de integração de plataformas compatíveis com sistemas amperométricos miniaturizados tem feito com que a comunidade acadêmica tenha recorrido ao uso de sistemas *lab-on-a-chip*, ou seja, sistemas que reproduzem processos feitos em laboratório, com dimensões e preço reduzidos, menor tempo de análise, menos etapas experimentais, etc [57]. Nesse

contexto, buscando-se alternativas ao uso desses eletrodos convencionais, diferentes tipos de sensores eletroquímicos descartáveis têm sido desenvolvidos, como os eletrodos impressos [57-58].

1.2.2 Eletrodos Impressos

O uso de eletrodos impressos apresentam vantagens quanto aos aspectos econômicos e práticos, como a produção em massa resultando em um baixo custo, a facilidade de manuseio e fabricação, possibilidade de baixo consumo de reagentes, possibilidade de descarte, etc [59-60].

Dentre essa classe de sensores descartáveis, os eletrodos impressos (SPEs) têm apresentado uma grande quantidade de resultados reprodutíveis e confiáveis, utilizando materiais de baixo custo e têm sido utilizados em análises ambientais, biológicas, químicas, etc [59,61]. Os SPEs podem ser construídos pela impressão de vários tipos de tintas em diferentes substratos, como cerâmica, plástico, entre outros, tendo como resultado diversas configurações e comportamentos eletroquímicos [59-62]. A Figura 7 mostra a configuração comumente utilizada para os eletrodos impressos.

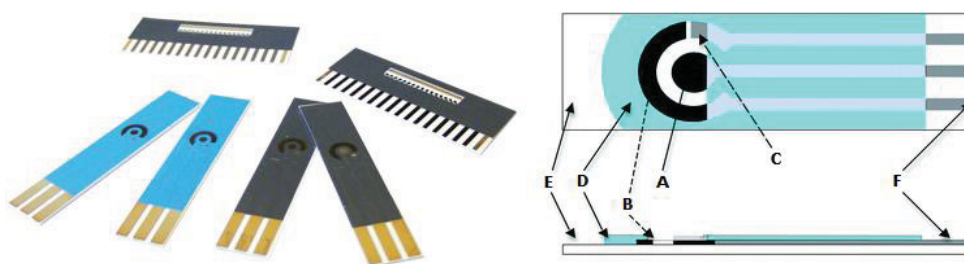


Figura 7. Representação de eletrodos impressos. (A) Eletrodo de trabalho; (B) contra eletrodo; (C) eletrodo de referência; (D) camada isolante; (E) substrato; (F) caminhos condutores. FONTE: (Adaptado) Pellicer, *et al.* [63].

O esquema de fabricação de eletrodos impressos comumente utilizado está representado na Figura 8.

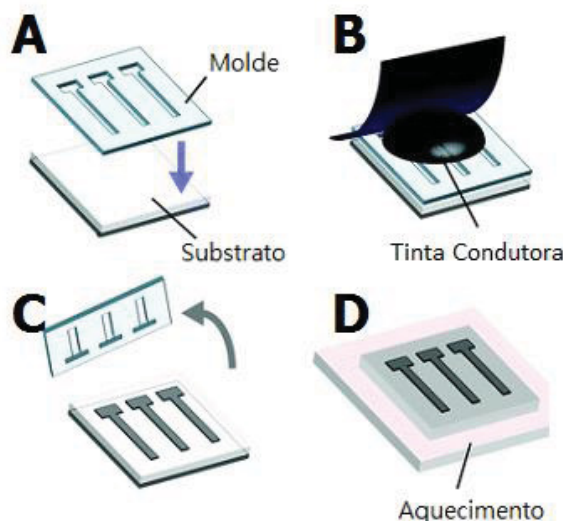


Figura 8. Representação esquemática da fabricação de eletrodos impressos comumente utilizada. (A) Molde é posicionado sobre a superfície do substrato; (B) Tinta condutora é colocada sobre o molde, sendo espalhada com o auxílio de um stencil ou rolo; (C) Após a secagem da tinta, o molde é retirado, sendo obtidos os eletrodos; (D) Finalmente, realiza-se uma etapa de cura da tinta impressa sobre o substrato. FONTE: (Adaptado) Godino, *et al.* [64].

Dentre os eletrodos impressos, os eletrodos impressos de carbono (SPCE) têm sido amplamente utilizados no desenvolvimento de sensores eletroquímicos devido ao baixo custo para obtenção da tinta de carbono, às baixas correntes de fundo e à ampla janela de potencial apresentada pelo material [65-66]. Além disso, a baixa toxicidade apresentada pelo carbono faz com que esse material seja adequado no desenvolvimento de eletrodos descartáveis [67].

Outra vantagem do uso das tintas de carbono em eletrodos impressos é a facilidade com que a superfície do eletrodo pode ser modificada, sendo pela imobilização de diferentes substâncias como filmes de metais, nanopartículas, polímeros, enzimas na superfície do eletrodo [59, 63] ou pela incorporação metais, enzimas, polímeros ou agentes complexantes na confecção da tinta [59, 64,68].

Pellicer e colaboradores [88] relataram a modificação da superfície de um SPCE com um polímero molecularmente impresso (MIP) seletivo ao inseticida fenitrothion, cuja resposta analítica foi linear nas concentrações de $3,0 \times 10^{-6}$ a $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, com um limite de detecção de $8,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e desvio padrão de 14%. A seletividade do sensor foi testada na presença de possíveis interferentes como metamitron e metil-paration, apresentando seletividade satisfatória. O

sensor desenvolvido foi aplicado em análises de fenitroion *in situ* em matrizes presentes em florestas.

Hatada e colaboradores [69] desenvolveram um sensor que utilizou um SPCE modificado com enzimas para a determinação de proteínas glicosiladas, como albumina glicosilada, importante indicador para o controle da glicemia para pacientes com diabetes. O sensor desenvolvido permitiu a análise de amostras contendo albumina glicosilada em pequenos volumes (1,3 μL) em 1 minuto e apresentou uma região linear variando de 0 – 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os autores concluíram que o sensor proposto se mostrou adequado para análises feitas na residência do paciente.

Apesar de serem utilizados em aplicações nas análises ambientais, industriais e clínicas, e das diversas vantagens apresentadas pelos SPCEs, a tinta de carbono utilizada para a obtenção destes apresenta solventes orgânicos em sua composição que podem danificar as estruturas dos grafites presentes na tinta, sendo que a utilização de SPCEs sem modificadores pode ocasionar em um comportamento eletroquímico não-ideal [67,70]. Sendo assim, a modificação da superfície de SPCEs utilizando diferentes materiais, como os nanomateriais, tem sido reportada na literatura [71-74].

Xin e colaboradores [73] relataram o desenvolvimento de um biossensor para determinação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) baseado um SPCE modificado com nanopartículas de ouro e óxido de ferro, enzimas e filme de grafeno. A região linear apresentada pelo biossensor variou de $2,0 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,9994$) com um limite de detecção de $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O biossensor foi utilizado para a determinação de H_2O_2 em amostras de soluções de limpeza de lentes de contato, apresentando alta sensibilidade e seletividade.

1.2.3 Nanomateriais

Com relação aos materiais com potencial para modificação de eletrodos, a nanociência e nanotecnologia tem possibilitado o uso de modificadores de eletrodos em dimensões reduzidas. Os princípios fundamentais de moléculas e estruturas e as aplicações de materiais de escala nanométrica, na ordem de 1 a 100 nanômetros, têm sido aplicados em áreas que envolvem diferentes campos

da ciência, como química, biologia, física, ciência de materiais e engenharia [75-76].

Os primeiros conceitos envolvendo a nanotecnologia foram discutidos pela primeira vez pelo físico Richard Feynman, em 1959 [77] e o termo “nanotecnologia” foi atribuído somente uma década depois pelo professor Norio Taniguchi [78]. Atualmente, para ser classificado como “nanomaterial”, um material em escala nanométrica deve apresentar características que diferem daquelas do seu material *bulk* e deve apresentar pelo menos uma de suas dimensões menor que 100 nm [79].

Essa diferença entre o material nanométrico e o material *bulk* ocorre devido às dimensões reduzidas do primeiro, resultando em mudanças significativas nas suas propriedades termodinâmicas, como o aumento da reatividade, atividade catalítica, e em suas propriedades elétricas e óticas [77-78]. A classificação dos nanomateriais é quanto as suas dimensões, de 0D a 2D, em que podem ser classificados como filmes finos, nanofios, nanobastões, nanotubos, nanopartículas, entre outros [80-84].

Diferentes tipos de materiais podem ser utilizados para a obtenção destas nanoestruturas, como carbono, boro, ouro, zinco, sílica, polímeros e até mesmo peptídeos [84], sendo os materiais carbonáceos os que têm recebido significativo destaque na comunidade acadêmica, devido ao baixo custo e a versatilidade apresentada pelo carbono [84-85]. Várias são as aplicações dos nanomateriais carbonáceos, como armazenamento de energia, catálise, tratamento de água, implantes médicos, liberação controlada de fármacos, bioinfiltração, entre outros, sendo alguns exemplos desses materiais os fullerenos, os grafenos e os nanotubos de carbono [85].

Os nanotubos de carbono (CNT) foram descobertos em 1991 por Iijima [86] e estruturalmente os nanotubos de carbono podem ser considerados como folhas de grafite “enroladas”, havendo dois tipos de CNTs: os nanotubos de parede única (SWCNT), que consistem em um único tubo e os nanotubos de paredes múltiplas (MWCNT), consistindo em vários tubos de grafeno concêntricos [87], como apresentado na Figura 9.

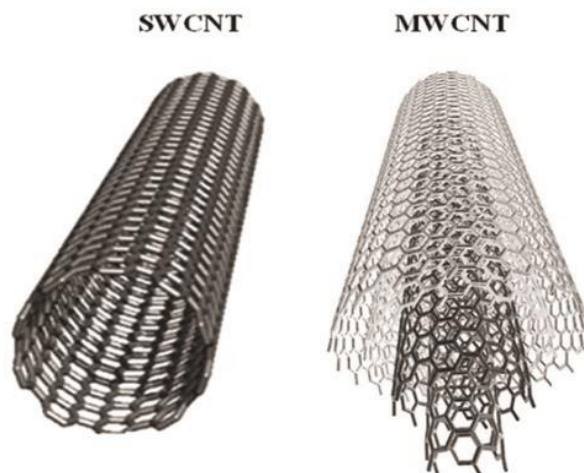


Figura 9. Ilustração representativa de nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT) e paredes múltiplas (MWCNT). FONTE: Google Imagens 2016.

Os CNT apresentam excelentes propriedades elétricas, devido à rápida cinética de transferência de elétrons, resultante da presença dos planos de borda (*edge planes*) grafíticos, presentes nas paredes e nas terminações dos nanotubos [88]. Além disso, os CNTs apresentam características como ampla área superficial, presença de nanoestruturas, ótimas propriedades mecânicas, fazendo com que estes materiais sejam amplamente aplicados em análises químicas [89-93].

Soltani e colaboradores [90] desenvolveram um sistema para a detecção de tório utilizando um SPCE modificado com MWCNTs. A presença de MWCNTs resultou num aumento na sensibilidade do dispositivo, sendo isso constatado utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. O sistema desenvolvido apresentou excelente linearidade entre $5,0 \times 10^{-10}$ e $2,2 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, com limites de detecção e quantificação de $0,17 \times 10^{-9}$ e $0,5 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹, respectivamente. O dispositivo foi aplicado para a determinação de tório em amostras aquosas, resultando em excelentes valores de recuperação de 98 a 103%.

Apesar das vantagens apresentadas sobre os MWCNTs, uma dificuldade experimental descrita na literatura tem sido a baixa capacidade dispersiva deste tipo de nanotubos em meio aquoso, sendo relatada a utilização de variações deste material com maior capacidade dispersiva e estabilidade, tal como os CNTs funcionalizados [88,94-95].

A funcionalização de CNTs consiste no ancoramento de grupos funcionais em sua estrutura, a qual pode ser obtida por reações químicas, a partir do

ancoramento direto de grupos funcionais na estrutura dos nanotubos [96-98]. Com a presença de grupos funcionais carboxílicos, há um aumento na área superficial específica e volume de poro específico, sendo que a hidrofiliabilidade dos grupos adicionados facilita a quebra dos feixes, acarretando em um aumento no número de defeitos estruturais deste material e num aumento da capacidade diispersiva em meios polares [96, 99-100]. A Figura 10 mostra uma representação esquemática da oxidação química de CNTs.

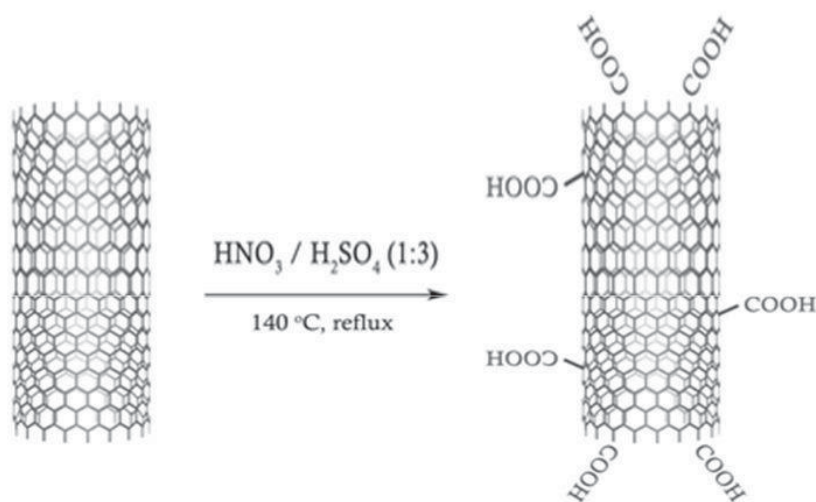


Figura 10. Representação esquemática da oxidação química de nanotubos de carbono. FONTE: Referência [101].

Gusmão e colaboradores [102] relataram o estudo do efeito da oxidação química nas propriedades dos CNTs através de técnicas como análise termogravimétrica e voltametria cíclica. Os CNTs oxidados foram utilizados como modificadores de um eletrodo impresso de carbono (SPCE) e o comportamento voltamétrico de compostos como hidroquinona, dopamina e ferricianeto foram estudados empregando o eletrodo modificado proposto. Os autores concluíram que os compostos que continham grupos que permitissem uma interação de pontes de hidrogênio apresentaram um incremento no valor de intensidade de corrente, indicando que os grupos funcionais presentes nos CNTs oxidados facilitaram a interação destes compostos com a superfície do eletrodo, resultando num aumento da sensibilidade do eletrodo.

1.3 HORMÔNIOS

Hormônios são mensageiros químicos responsáveis pela comunicação entre diferentes tipos de células, os quais identificam os hormônios através de receptores, cujas estruturas proteicas específicas realizam o reconhecimento molecular destes receptores [103]. Estas substâncias químicas são produzidas por glândulas endócrinas, que liberam as secreções diretamente na corrente sanguínea, sendo essas substâncias liberadas as responsáveis por controlar e regular a atividade de tecidos e órgãos que controlam a reprodução, desenvolvimento embrionário, crescimento e metabolismo [104].

Os hormônios podem ser quimicamente classificados em quatro grupos: derivados de aminoácidos (aminoácidos modificados); polipeptídeos e proteínas (cadeia de aminoácidos); esteroides (derivados de colesterol) e eicosanoides (derivados de ácidos graxos) [104]. Produzidos a partir do colesterol, os hormônios sexuais, ou esteroides, são classificados em três principais grupos: os estrógenos (hormônios sexuais femininos), os andrógenos (hormônios sexuais masculinos) e os progestógenos (hormônios da gravidez) [103], sendo essas substâncias caracterizadas pela presença de quatro anéis carbônicos interligados [104].

Dentre os hormônios esteroides, os hormônios sexuais estrógenos têm sido motivo de estudos, tanto por sua aplicação na área farmacêutica, utilizados na terapia de reposição hormonal, como por sua relevância social e ambiental, visto que esses hormônios são utilizados em métodos contraceptivos por mulheres [103,105]. Os hormônios excretados na urina e fezes seguem para a rede coletora e a disposição incorreta destes efluentes *in natura* (ou mesmo processados), causada pelo déficit da infraestrutura em saneamento e/ou pela ineficiência das estações de tratamento, tem resultado na contaminação de ambientes aquáticos, sendo esses hormônios estrógenos classificados como poluentes orgânicos [103]. Os principais hormônios estrógenos utilizados para essas finalidades são 17- β -estradiol, estrona, estriol e progesterona, sendo as suas estruturas químicas apresentadas na Figura 11.

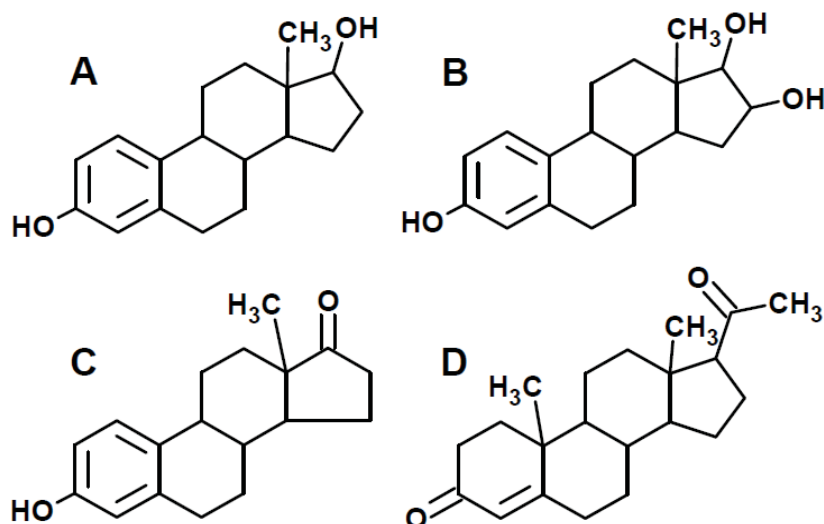


Figura 11. Estruturas químicas dos hormônios estrógenos (A) 17-β-estradiol, (B) estriol, (C) estrona e (D) progesterona. FONTE: a autora (2017).

A deficiência destes hormônios tem como sintomas distúrbios menstruais, atrofia da genitália, sintomas vasomotores e problemas psicológicos. Apesar de serem amplamente empregados, há estudos que sugerem a ocorrência de potenciais riscos, incluindo câncer de mama, câncer endometrial, entre outros, devido ao uso contínuo destas substâncias [24,105-107].

Como já citado anteriormente, os estrógenos podem ser considerados como responsáveis pela maioria dos efeitos disruptores endócrinos em ambientes aquáticos, ou seja, efeitos que interferem na função hormonal do corpo humano e de organismos aquáticos, sendo esses efeitos desencadeados pela disposição incorreta de efluentes. Há relatos que a presença destes hormônios nesses ambientes tem resultado no desenvolvimento de características femininas em machos de peixes, aves e até mesmo jacarés [103].

O esquema apresentado na Figura 12 ilustra os efeitos desencadeados pela ação dos estrógenos sobre o sistema endócrino, resultando em perturbações nos mecanismos de controle desse sistema, alterando até mesmo a homeostase, responsável pela manutenção do equilíbrio metabólico dos organismos.

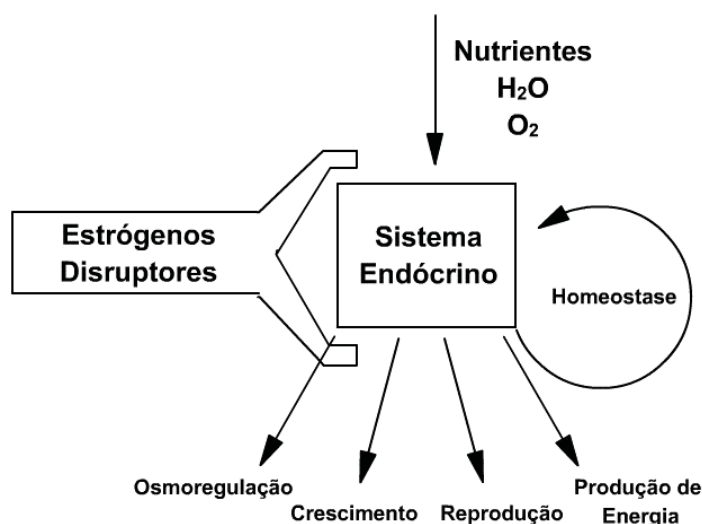


Figura 12. Representação esquemática da ação tóxica dos estrógenos sobre os mecanismos de controle do sistema endócrino. FONTE: Reis Filho, *et al.* [103].

1.3.1 Estriol

O estriol é um hormônio comumente encontrado em mamíferos e é um dos mais abundantes estrogênios encontrados durante o período de gravidez, sendo que os baixos níveis deste hormônio em mulheres grávidas podem ser utilizados como indicativos de Síndrome de Down fetal [103,108]. Apesar de ser utilizado no tratamento da menopausa em mulheres [109-110], a ingestão contínua de estriol, quando administrado oralmente em doses que variam de 1 a 2 mg por dia, podem ocasionar no aumento no risco de câncer e hiperplasia endometrial [111]. Paralelamente a isso, o estriol também é considerado um disruptor endócrino [112-114], tornando a sua quantificação de grande interesse para a química analítica.

A determinação de estriol em amostras de fluidos humanos e em amostras ambientais tem sido realizada utilizando diferentes técnicas, como a cromatografia [115-116], imunoensaios [108,117-118] e eletroforese [119-120].

A determinação de estriol e diferentes estrogênios como α -estradiol, β -estradiol, estrona, etinilestradiol foi relatada por Matějček *et al.* [116], utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada a um sistema de massas, visando a determinação destes hormônios em sedimentos de rios. Os autores utilizaram uma coluna C_{18} na etapa de análise cromatográfica, sendo realizada uma etapa prévia de extração utilizando micro-ondas. Os valores de recuperação variaram

de 83 a 107% com desvios padrão variando de 4,9 a 9,6% para o método proposto. Os limites de detecção para os hormônios foram inferiores a 1 ng g⁻¹.

Tang e colaboradores [108] propuseram um imunoensaio, utilizando anticorpos conjugados, visando à determinação de estriol, obtendo um limite de detecção de 0,35 nmol L⁻¹. Os desvios entre as medidas variaram de 5 a 6%, apresentado um valor médio de recuperação de 102,6%. O método proposto foi aplicado para a determinação de estriol em amostras de soro plasmático materno.

Pérez e colaboradores [121] relataram a determinação de estrogênios como estriol, 17β – estradiol, entre outros utilizando cromatografia líquida com arranjo de diodos como detector. Amostras de água mineral, pluviais e subterrâneas foram analisadas e os limites de detecção para os hormônios variaram entre 3 e 13 ng L⁻¹, com desvios variando entre 2 e 11 %.

Apesar da elevada sensibilidade apresentada pelos métodos cromatográficos convencionais, estes apresentam desvantagens como a necessidade de pré-concentração e/ou etapas de separação e alto custo instrumental [122]. Neste contexto, as técnicas eletroquímicas têm se mostrado como alternativas interessantes na determinação de estriol, devido às suas características como simplicidade operacional, baixo custo, respostas rápidas, alta sensibilidade, possibilidade de miniaturização e automação [40]. Essas vantagens têm aumentando o interesse da comunidade acadêmica na aplicação de técnicas voltamétricas e amperométricas na determinação de hormônios, como o estriol [123-125].

Santos e colaboradores [109] propuseram um método eletroanalítico utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada e um eletrodo de diamante dopado com boro (BDDE) como eletrodo de trabalho, visando à determinação de estriol em amostras farmacêuticas e de urina, coletadas durante o período de gravidez. A curva analítica foi obtida com concentrações entre $2,0 \times 10^{-7}$ a $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ ($r = 0,9994$), com limites de detecção e quantificação de $1,7 \times 10^{-7}$ e $8,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, respectivamente. Os valores de recuperação variaram de 98,6 a 101,0% para as amostras farmacêuticas e 100,2 a 103,4% para as amostras de urina.

Cincotto e colaboradores [126] relataram sobre um método eletroanalítico utilizando um biosensor amperométrico visando à determinação de estriol em amostras de urina. A curva analítica apresentou comportamento linear entre $2,5 \times$

$10^{-8} - 1,03 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e um limite de detecção de $1,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. O valor de recuperação foi 100,2 %, com um desvio de 1,0%, sugerindo a boa confiabilidade do método desenvolvido.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Construir e avaliar um dispositivo eletroquímico microfluídico baseado em fios de algodão (μ TED), contendo um eletrodo impresso de carbono modificado com nanotubos de carbono funcionalizados como sistema de detecção, visando a determinação de estriol em amostras farmacêuticas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o comportamento voltamétrico do estriol sobre eletrodos modificados e não modificados;
- Acoplar o SPCE/CNT como sistema de detecção no dispositivo proposto e verificar sua potencialidade na determinação de estriol;
- Otimizar os parâmetros experimentais visando proporcionar maior sensibilidade do sensor na determinação de estriol;
- Aplicar o sensor desenvolvido na determinação de estriol em amostras farmacêuticas;
- Verificar a exatidão e a precisão dos resultados obtidos pelo método proposto através da comparação com o procedimento analítico oficial.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico e foram utilizados sem uma etapa prévia de purificação. Acetato de sódio e ácido acético foram obtidos da empresa Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil) e foram utilizados para preparar a solução tampão de acetato. As soluções tampão foram preparadas utilizando etanol: água, na proporção 7:3 (v/v) e na concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão acetato. As soluções padrão de estriol (pureza 97%) foram preparadas em etanol: água na proporção 1:1 (v/v) utilizando estriol obtido da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura (resistividade específica $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtida através do sistema de purificação de água Millipore Direct-Q3 (Bedford, MA, EUA) e etanol obtido da empresa Neon (São Paulo, SP, Brasil).

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (CNTs) (pureza 95%, comprimento $1,5 \text{ }\mu\text{m}$ e diâmetro 10 nm) foram adquiridos da DropSens e o tratamento ácido foi realizado em ácido sulfúrico e ácido nítrico das marcas Neon e Proquimios (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), respectivamente. O isopropanol utilizado no preparo da dispersão de CNTs foi obtida da empresa Neon.

Os materiais utilizados para a construção do dispositivo eletroquímico baseado em fios têxteis (μTED) ($10,5 \text{ cm}$ de comprimento e aproximadamente $0,8 \text{ mm}$ de diâmetro) foram obtidos em um mercado local (Curitiba, PR, Brasil). Os materiais utilizados incluem fita dupla face, gaze de algodão, placas de vidro e reservatórios poliméricos. Os barbantes foram obtidos a partir dos fios da gaze de algodão, segundo descrito por Agustini e colaboradores [48]. Os fios foram retirados da gaze de algodão com auxílio de pinças.

O ajuste do pH das soluções utilizadas durante as medidas eletroquímicas foram feitos utilizando soluções de H_2SO_4 e NaOH , ambas nas concentrações de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

3.2 FABRICAÇÃO DOS ELETRODOS IMPRESSOS DE CARBONO (SPCE)

Os SPCEs utilizados consistiram em um eletrodo de trabalho e um contra eletrodo, ambos de grafite e um eletrodo de referência Ag/AgCl. Os SPCEs, com eletrodo de trabalho de 3 mm de diâmetro, foram fabricados utilizando a impressora microDEK 1760RS (DEK, Weymouth, Reino Unido), com moldes próprios para o design desejado. Para cada eletrodo fabricado, uma tinta de grafite (Código do produto: C2000802P2; Gwent Electronic Materials Ltd, Reino Unido) foi impressa em um filme de poliéster flexível (Autostat, 250 μm de espessura). A tinta de grafite foi utilizada para promover a conexão eficiente entre os três eletrodos e funciona como material base para o eletrodo de trabalho e contra eletrodo.

Após o tempo de cura da camada de grafite impresso em um forno a 60 °C por 30 minutos, uma camada de pasta Ag/AgCl (Código do produto: C2040308D2; Gwent Electronic Materials Ltd, Reino Unido) foi impressa sobre o substrato de poliéster para obtenção do pseudoeletrodo de referência Ag/AgCl. Após a impressão, a cura da tinta foi realizada igualmente como para a tinta de carbono, foi feita em um forno a 60 °C por 30 minutos. Finalmente, uma tinta dielétrica (Código do produto: D2070423D5; Gwent Electronic Materials Ltd, Reino Unido) foi impressa sobre o substrato flexível de modo a realizar a cobertura das conexões e definir a área ativa do eletrodo, incluindo a área do eletrodo de trabalho. Após o tempo de cura a 60 °C por 30 minutos, os SPCEs foram finalizados e prontos para uso.

3.3 FUNCIONALIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO (CNTs)

A funcionalização ácida dos CNTs consistiu em um tratamento oxidativo, em que os CNTs foram mantidos sob aquecimento em refluxo, em uma mistura de 3,0 mol L⁻¹ HNO₃/H₂SO₄, na proporção 1:3 (v/v) por 6 horas sob agitação magnética. Após esse período, a mistura foi resfriada a temperatura ambiente e os materiais funcionalizados foram filtrados por filtração a vácuo, utilizando-se papel filtro quantitativo, da marca Unifil, lavados com água deionizada até pH 7,0. Os CNTs foram deixados em estufa a 50 °C por 12 h.

3.4 MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS IMPRESSOS DE CARBONO (SPCE)

Para a modificação do SPCE, uma dispersão de CNT foi obtida dissolvendo-se 0,5 mg de CNT seco em 1,0 mL de mistura de isopropanol e polímero Nafion®, na proporção 0,01 % (v/v). A superfície do eletrodo de trabalho do SPCE foi modificada com uma alíquota de 4,0 µL da dispersão de CNT, seguida da posterior evaporação do solvente utilizado (*drop-casting*).

3.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ELETRODOS IMPRESSOS E NANOTUBOS DE CARBONO

A caracterização morfológica dos eletrodos impressos foi feita através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os CNTs utilizados foram caracterizados através das técnicas de Espectroscopia na Região do Infravermelho, Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Espectroscopia Raman.

Para avaliar a modificação dos eletrodos impressos com os CNTs funcionalizados, foram obtidas imagens de MEV. Foram analisadas as morfologias de dois eletrodos impressos: um não modificado e outro modificado com CNTs funcionalizados. Os eletrodos impressos foram fixados no porta amostra de alumínio (disco de alumínio, com 32 mm de diâmetro) do equipamento com uma fita dupla face de cobre. As imagens foram obtidas com elétrons secundários, com uma aceleração de voltagem de 30 kV. A marca do equipamento utilizado foi FEI, modelo Quanta FEG 450, sendo esse um equipamento de alta resolução. As imagens foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica.

Para verificar os grupos funcionais presentes na estrutura dos CNTs, realizaram-se medidas através da técnica Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier. Os CNTs em pó foram homogeneizados com KBr, previamente seco, e prensado formando uma pastilha. Para obtenção dos espectros, utilizou-se um espectrofotômetro BOMEN, disponibilizado no Departamento de Química. Foram feitos 212 scans de 4000 a 400 cm⁻¹.

Aplicou-se a MET para verificar a morfologia dos CNTs. Um volume de 20 μL de uma suspensão de CNTs, de concentração $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ (em metanol e nafion 0,01% m/m), foram colocados sobre o porta amostra (grade de cobre de 200 mesh com filme de Formvar, um coloide carbonáceo), sendo o solvente evaporado a temperatura ambiente num período de 24h. Após a secagem do solvente, o porta amostra foi inserido no equipamento JEOL, modelo JSM 6360-LV, sendo análise realizada com uma aceleração de voltagem de 120 kV.

Para a Espectroscopia Raman, colocou-se o CNT seco sobre uma lâmina de vidro e inseriu-se a amostra no equipamento WITech, modelo Alpha 300R. Utilizou-se um laser de coloração verde, de comprimento de onda 532 nm. Cada espectro passou por 50 acumulações e um tempo de integração de 5 segundos.

3.6 CONSTRUÇÃO DO DISPOSITIVO ELETROQUÍMICO BASEADO EM FIOS TÊXTEIS (μTED)

O dispositivo eletroquímico proposto foi desenvolvido pelo simples arranjo dos componentes, não necessitando de pessoal especializado para a sua construção. Placas de vidro (25 mm de comprimento, 6,5 mm de espessura e 90, 60 e 30 mm de largura) foram utilizadas como substrato para o arranjo do μTED . O esquema apresentado na Figura 13 mostra a estrutura do dispositivo construído.

As etapas de construção do dispositivo estão representadas na Figura 13 e consistiram em (1) empilhamento das placas de vidro, (2) fixação dos reservatórios de entrada e saída (ambos com capacidade de aproximadamente 4 mL), (3) colocação de duas fitas dupla face próximas aos reservatórios, (4) acomodação do SPCE modificado sobre a fita dupla face próxima ao reservatório de saída, (5) fixação do arranjo de microcanais formados pelos barbantes hidrofílicos (9 fios paralelos sem torção) do reservatório de entrada para o de saída, (6) colocação de duas fitas dupla face no final dos fios de barbante. A zona de detecção foi coberta com pedaços de barbante menores, de modo a manter todos os eletrodos imersos na solução carregadora durante as medidas amperométricas. A injeção de padrões e amostras foi realizada com o uso de uma micropipeta diretamente sobre o canal microfluídico no local indicado. A Figura 14 mostra o dispositivo após a etapa de construção.

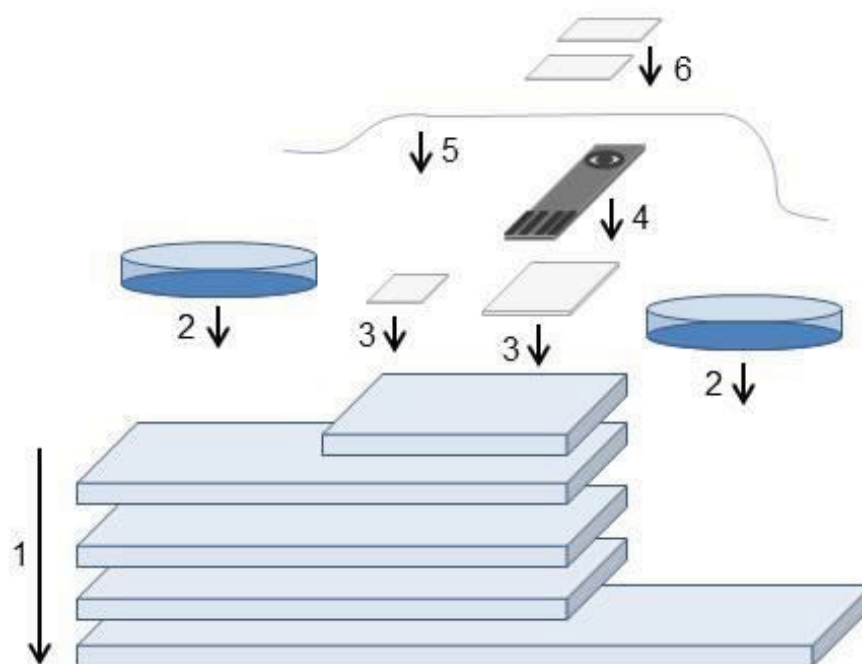


Figura 13. Esquema de construção do dispositivo microfluídico, com as etapas de construção representadas pelos números 1 a 6.

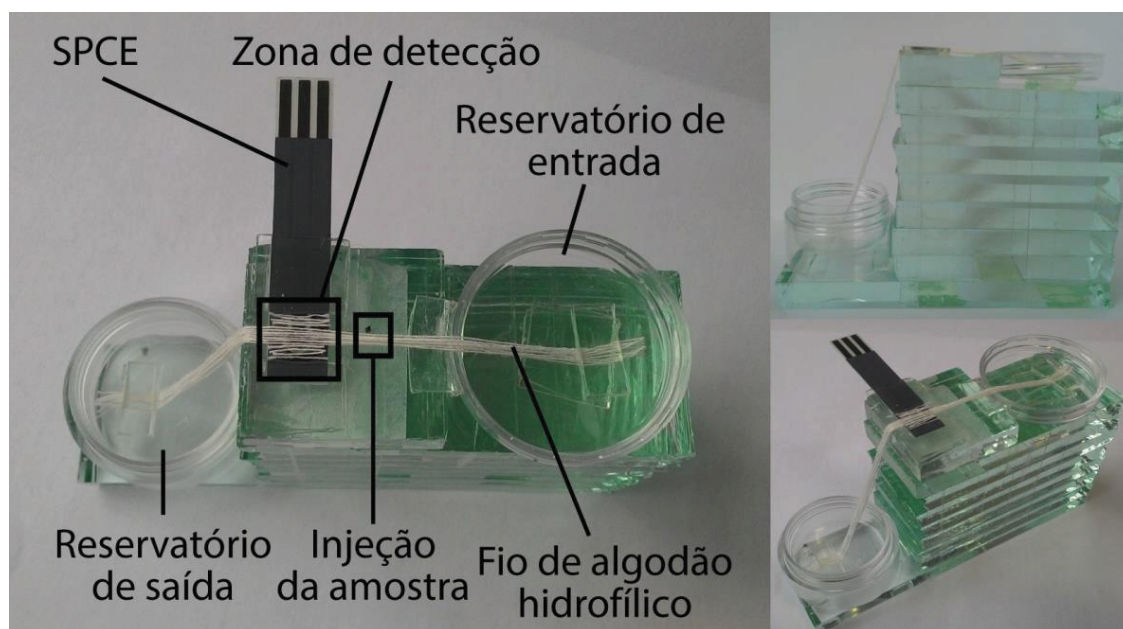


Figura 14. Fotografias do μ TED após processo de construção.

3.7 AVALIAÇÃO DA VAZÃO DO DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO

De modo a avaliar o escoamento do fluxo de solução no μ TED, o reservatório de saída foi colocado sobre uma balança analítica Mettler Toledo AL204 (Columbus, OH, EUA) e o dispositivo foi colocado a uma distância aproximada de 26 mm, com o auxílio de uma garra e um suporte universal. A quantidade de eletrólito suporte que fluiu pelo dispositivo foi monitorada pela diferença de massa do reservatório de saída a cada 60 segundos, sendo a pesagem iniciada quando a primeira gota de solução foi carregada pelos microcanais. A temperatura ambiente foi mantida em 20°C durante o período em que os experimentos foram realizados.

A cada 60 segundos, a massa do reservatório de saída foi registrado com o auxílio de uma câmera, visando melhorar a precisão das medidas. Pesou-se a massa de 1 mL do eletrólito suporte utilizado e obteve-se a densidade de 0,9971 g cm⁻³, sendo esse valor utilizado para converter os valores de massa para volume. O fluxo foi obtido pela razão entre o volume de solução e tempo.

3.8 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA E PROCEDIMENTO ANALÍTICO

As medidas eletroquímicas foram feitas a 20°C utilizando um potenciostato/ galvanostato μ Autolab Tipo III (Metrohm Autolab, Utrecht, Holanda) e o software Nova 1.10. O comportamento voltamétrico do estriol foi estudado através da voltametria cíclica utilizando uma célula convencional de três eletrodos. Para essa etapa, o eletrodo de trabalho foi o eletrodo de carbono vítreo (GCE), o eletrodo de referência de Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹) e um contra eletrodo de platina. Para a determinação amperométrica, o SPCE foi usado juntamente com o μ TED. O design do SPCE utilizado neste trabalho está apresentado na Figura 15.

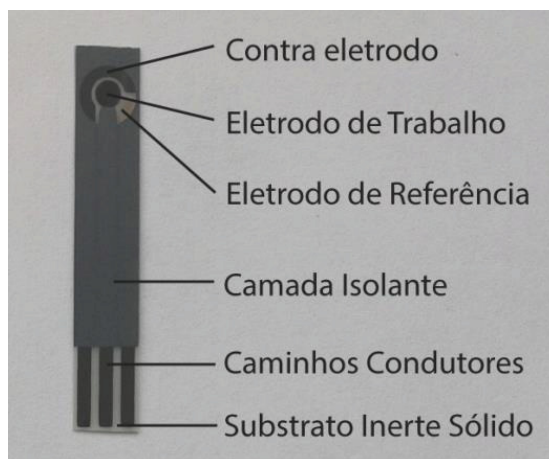


Figura 15. Representação do SPCE utilizado neste trabalho.

O SPCE foi utilizado sem pré-tratamento e conectado ao potenciostato para as medidas amperométricas. Solução de ácido acético em pH 3,0 foi adicionada ao reservatório de entrada, até o total preenchimento deste, e alíquotas de 2,0 μL da solução do analito foram injetadas utilizando uma micropipeta diretamente sobre o canal microfluídico (barbante) a uma distância de 10 mm da zona de detecção.

3.9 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA FARMACÊUTICA

As amostras farmacêuticas foram preparadas a partir de comprimidos contendo estriol. Um comprimido de estriol foi macerado com auxílio de almofariz e pistilo, sendo dissolvido em uma quantidade de eletrólito suporte. Utilizando um papel filtro, da marca Unifil, foi feita uma etapa de filtração, em que se pode retirar os excipientes não-dissolvidos. O filtrado recolhido foi colocado em um balão volumétrico de 25 mL, sendo avolumado com o do eletrólito suporte. A partir dessa solução estoque, foram preparadas as amostras S_1 e S_2 . A amostra S_1 foi preparada diluindo-se 5,0 mL da solução estoque em 10,0 mL de eletrólito suporte. A amostra S_2 foi preparada do mesmo modo que a amostra S_1 , mas contendo uma etapa extra, em que se adicionou 70,0 μL de uma solução padrão de estriol $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, obtendo-se assim uma amostra S_2 fortificada.

3.10 MÉTODO COMPARATIVO: ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

As medidas espectrofométricas foram realizadas utilizando o Espectrofotômetro Femto (São Paulo, SP, Brasil) e cubetas de quartzo. O software utilizado durante as medidas foi FemtoScan Software. A amostra farmacêutica foi analisada como especificado na Farmacopeia Europeia [127]. Uma massa de 25,0 mg da amostra comercial triturada contendo estriol foi pesada. A amostra foi dissolvida em etanol e diluída para 50,0 mL com o mesmo solvente. Em seguida, 10,0 mL desta solução foram diluídos para 50,0 mL com o mesmo solvente e a solução resultante foi filtrada utilizando papel filtro, da marca Unifil. As medidas foram feitas no comprimento de onda de 281 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ELETRODOS IMPRESSOS

Inicialmente, foi realizada a caracterização estrutural e morfológica dos CNTs empregando a Espectroscopia no Infravermelho, Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Espectroscopia Raman. Posteriormente, foram realizadas medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das superfícies dos eletrodos, modificados e não modificados, visando verificar eventuais mudanças morfológicas.

A espectroscopia no infravermelho fornece evidências da presença de diferentes grupos funcionais na estrutura orgânica de uma substância, devido à interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em um processo de vibração molecular, sendo que as ligações covalentes que constituem as moléculas orgânicas estão em constantes movimentos axiais e angulares [128-129]. A técnica de Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier foi utilizada para verificar a presença de alguns grupos funcionais oxigenados, como carboxílicos, alcoólicos, fenólicos, aldeídicos e cetônicos, na estrutura dos CNTs [130]. O espectro na região do infravermelho dos CNTs utilizados estão apresentados na Figura 16.

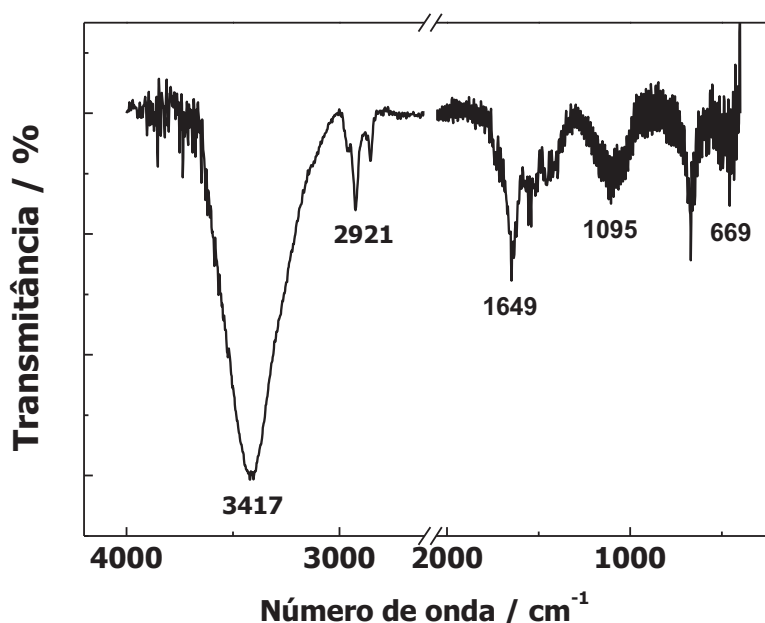


Figura 16. Espectro na região do infravermelho dos CNTs tratados utilizados na modificação do eletrodo de trabalho.

Os picos em $\sim 660\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ podem ser atribuídos aos estiramentos das ligações C-H e C-O, respectivamente. O estiramento das ligações C-O podem estar associados aos grupos carboxílicos, cetônicos e aldeídicos presentes na estrutura. Em $\sim 3420\text{ cm}^{-1}$ observa-se um pico largo característico referente ao estiramento das ligações O-H. A banda intensa em $\sim 1095\text{ cm}^{-1}$ está relacionada com a presença de grupos carbonilas, com uma banda em $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$ indicando as deformações axiais -CH [129].

AS imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) estão apresentadas na Figura 17.

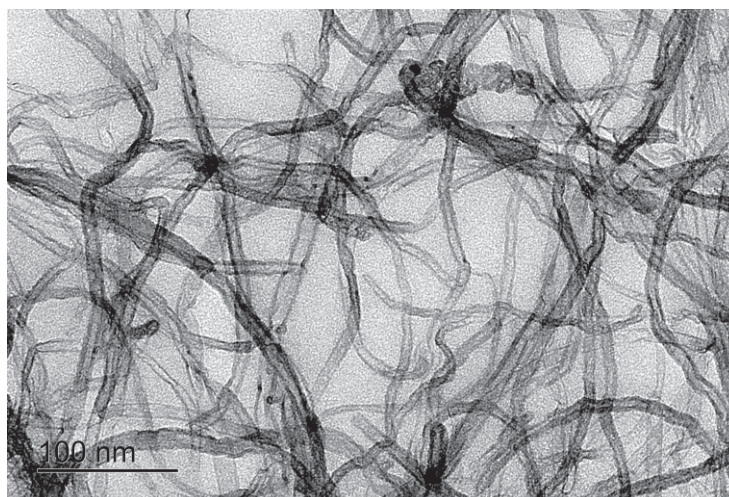


Figura 17. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) dos CNTs utilizados na modificação do eletrodo de trabalho.

Através das imagens de MET, foi possível verificar a presença de CNTs com um diâmetro médio de 10,2 nm, com estruturas curvas e enoveladas. É importante ressaltar que na literatura, há relatos dos efeitos da funcionalização de CNTs na estrutura dos mesmos, em que os CNTs puros apresentaram estruturas com paredes perpendiculares e com formação de feixes, diferentemente do apresentado na Figura 17. Isso indica que a funcionalização altera a morfologia dos CNTs, provavelmente aumentando o número de defeitos em sua estrutura [131].

O espectro Raman obtido apresentou um comportamento típico para os CNTs, sendo o espectro apresentado na Figura 18.

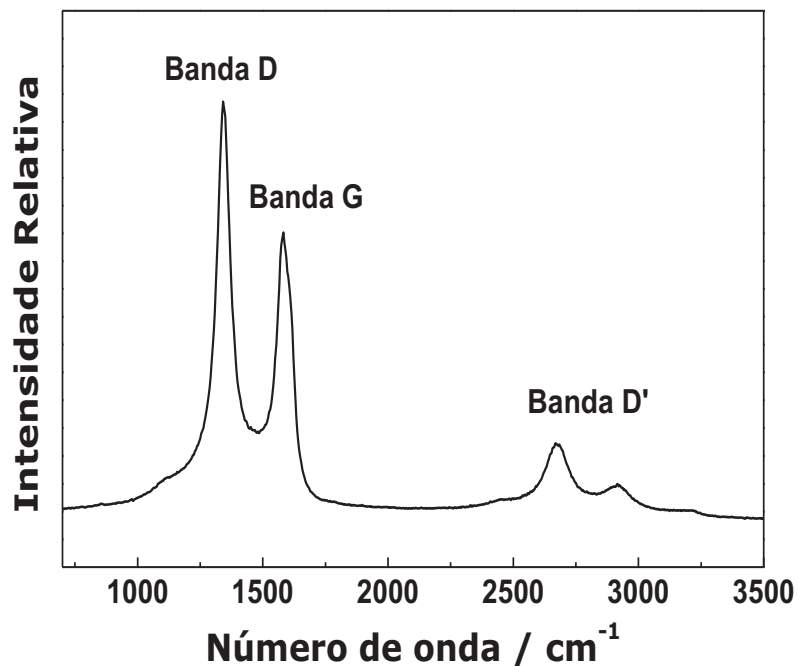


Figura 18. Espectro Raman dos nanotubos de carbono funcionalizados utilizados na modificação dos eletrodos impressos.

Analisando o espectro Raman, é possível perceber que as bandas relacionadas ao material gráfitico podem ser encontradas em: $\sim 1350\text{ cm}^{-1}$ (Banda D), devido à presença de defeitos na estrutura carbonácea; $\sim 1580\text{ cm}^{-1}$ (Banda G), atribuídos ao estiramento simétrico C – C nas estruturas similares ao grafeno; $\sim 2700\text{ cm}^{-1}$ (Banda D'), induzida pela desordem e defeitos estruturais [132].

A caracterização morfológica da superfície dos SPCE não modificados e modificados foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), sendo as imagens representativas obtidas apresentadas na Figura 19.

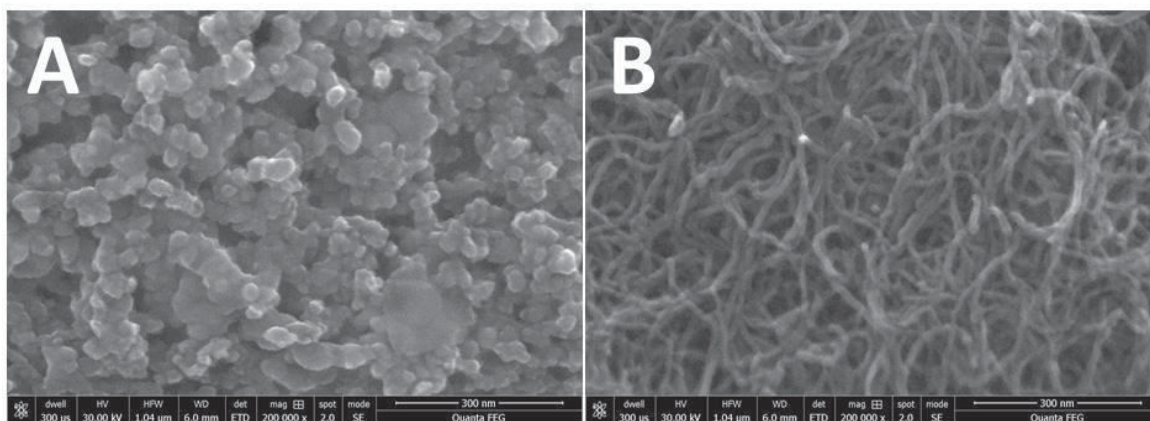


Figura 19. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da superfície dos SPCE não modificados (A) e modificados (B) com CNT.

É possível observar a superfície rugosa do eletrodo não modificado em Fig. 19A e a presença de nanoestruturas tubulares na superfície deste após a sua modificação em Fig. 19B. A presença de CNTs resultou numa diferença morfológica significativa entre essas duas superfícies e um total recobrimento da superfície do eletrodo com os CNTs após a modificação.

4.2 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO ESTRÍOL

Para as medidas voltamétricas, inicialmente foi utilizado um eletrodo de carbono vítreo (GCE), modificado e não modificado, como eletrodo de trabalho e o comportamento voltamétrico do hormônio estriol pode ser observado na Figura 20.

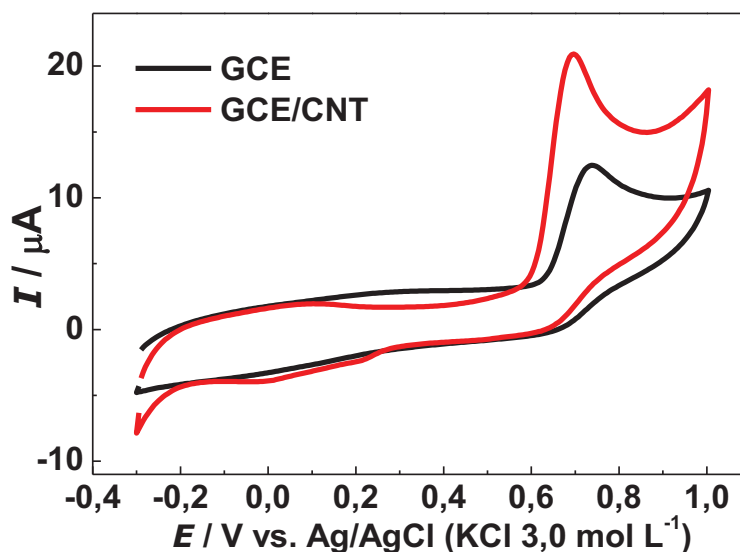


Figura 20. Voltamogramas cíclicos comparativos utilizando o GCE e o GCE/CNT como eletrodos de trabalho. Os voltamogramas foram obtidos na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de estriol, em solução de tampão acetato e etanol $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ (1:1) em pH 5,0. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

É possível observar para os eletrodos modificado (GCE/CNT) e não modificado (GCE), houve a presença de um pico de corrente em 0,70 V referente a oxidação do estriol. A reação de oxidação do estriol já é relatada na literatura [30] e está apresentada na Figura 21.

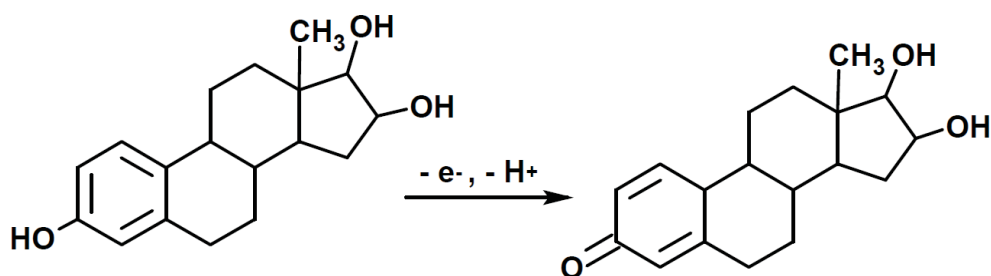


Figura 21. Esquema da reação de oxidação do estriol.

A ausência do pico de redução na varredura reversa sugere que a reação de oxidação é um processo irreversível, nas condições experimentais adotadas. A oxidação irreversível da cadeia carbônica em potenciais altos pode promover a formação de espécies de carbono covalentemente ligadas na superfície do eletrodo. Além disso, a oxidação de grupos fenólicos resulta na geração de radicais fenoxila, altamente reativos e que podem acarretar em uma reação de

polimerização, levando a formação de um filme polimérico na superfície do eletrodo, resultando em depósitos fortemente aderidos e não eletroativos [52-54].

Para os voltamogramas obtidos com o eletrodo modificado é possível verificar a influência dos nanotubos de carbono funcionalizados (CNTs) sobre o comportamento voltamétrico do estriol, em que se pode observar o aumento no valor de pico de corrente em 0,70 V (aproximadamente 100% de aumento para estriol), sendo as prováveis causas desse aumento as características do próprio material, como a presença de estruturas nanométricas e à maior exposição de planos de borda (majoritariamente responsáveis pela transferência eletrônica), resultando em uma maior área superficial [87]. Além disso, os CNTs funcionalizados apresentam uma grande afinidade com hidrocarbonetos aromáticos e grupos fenila, podendo promover uma interação mais efetiva dos hormônios na superfície do eletrodo, resultando em uma maior sensibilidade [52-53, 94]. Portanto, é possível perceber a potencialidade do uso de CNTs como modificadores da superfície de eletrodos, visando melhorar o desempenho analítico do eletrodo.

A tendência de envenenamento da superfície do eletrodo foi estudada através de voltamogramas cíclicos consecutivos (10 ciclos) e os voltamogramas referentes a este estudo estão apresentados na Figura 22.

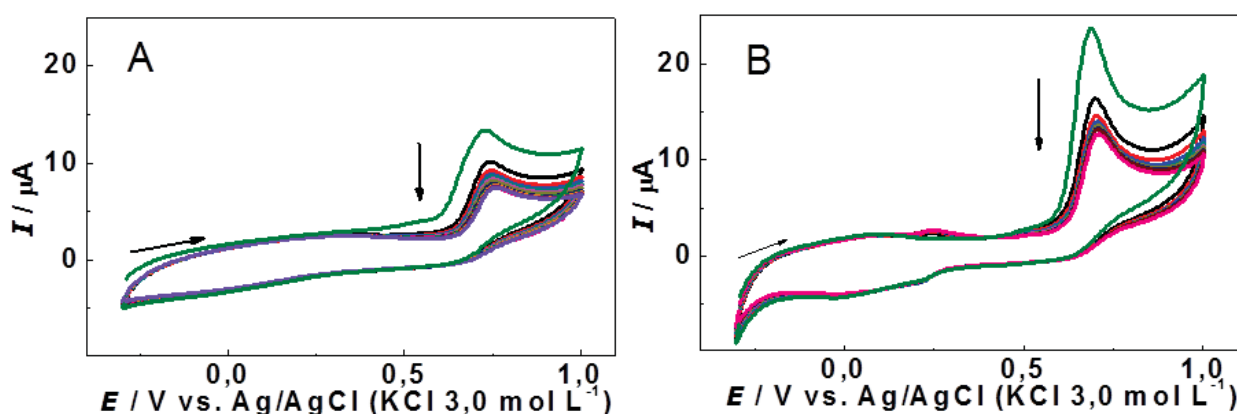


Figura 22. Voltamogramas cíclicos consecutivos obtidos na presença de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de estriol, em solução de tampão acetato e etanol 0,25 mol L⁻¹ (1:1) em pH 5,0. Utilizando (A) GCE e (B) GCE/CNT como eletrodos de trabalho. Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

Uma diminuição nos valores de corrente de pico pode ser observada com o aumento do número de ciclos voltamétricos, como apresentado da Tabela 1,

sendo que esse decaimento de corrente sugere a ocorrência de um envenenamento gradual da superfície eletródica, provavelmente devido à formação de um filme polimérico resultante da oxidação de grupos fenólicos presentes na estrutura do estriol [113].

Tabela 1. Porcentagem de decaimento de corrente referente ao estudo de envenenamento da superfície dos eletrodos GCE e GCE/CNT.

GCE		GCE/CNT	
Corrente de pico / μA	Porcentagem de corrente / %	Corrente de pico / μA	Porcentagem de corrente / %
7,83	100,0	18,5	100,0
6,86	87,6	11,7	62,9
6,32	80,7	10,5	56,9
5,76	73,5	10,0	54,1
5,55	70,8	10,0	54,0
5,48	70,0	9,95	53,7
5,53	70,6	10,2	55,0
5,33	68,1	10,2	55,0
5,13	65,4	9,81	52,9
5,21	66,6	9,63	52,0

Apesar de essa tendência ser observada para ambos os eletrodos, é possível observar na Figura 22B e 22B e através da Tabela 1, a ocorrência da estabilização dos picos de corrente em maiores valores de corrente para o GCE/CNT, em que os valores de corrente para o terceiro até o décimo ciclo apresentam uma variação não significativa, o que sugere que a presença de CNT na superfície do eletrodo minimiza a passivação da superfície [133-136].

A influência da velocidade de varredura na oxidação do estriol foi estudada variando-se de 5 a 100 mV s^{-1} e os voltamogramas cíclicos referentes estão apresentados na Figura 23.

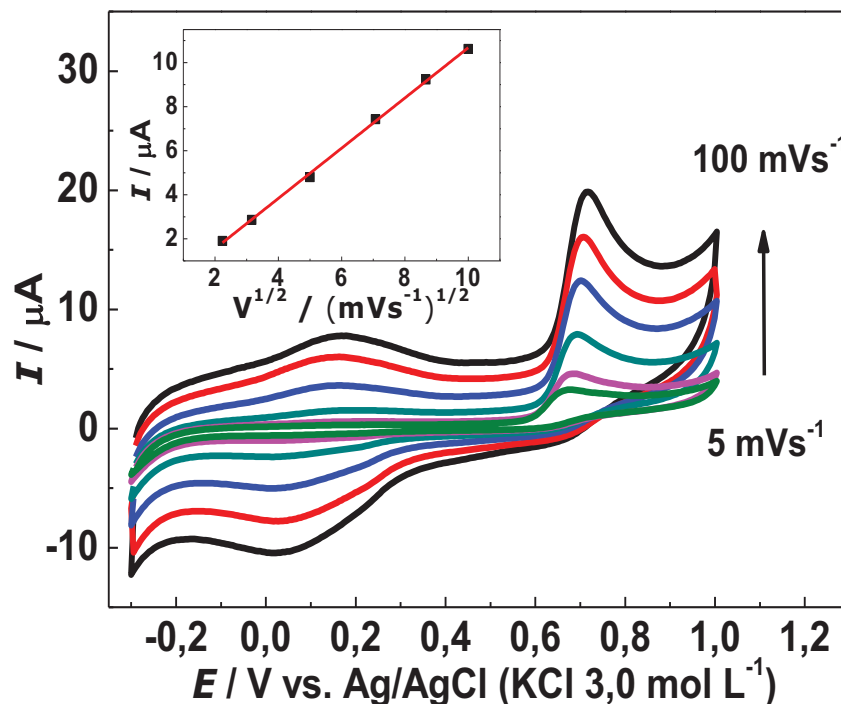


Figura 23. Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de $1,0 \times 10^{-3}$ de estriol, em solução de tampão acetato e etanol $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ (1:1) em pH 5,0, variando de 5 – 100 mVs^{-1} . GCE/CNT foi utilizado como eletrodo de trabalho. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

O deslocamento sutil do potencial de pico para valores mais positivos com o aumento da velocidade de varredura está em concordância com o comportamento eletroquímico irreversível de estriol, como relatado na literatura [109]. É possível observar um aumento na corrente de pico com a velocidade de varredura e o ajuste linear *i versus* $v^{1/2}$ ($R^2 = 0,998$) indica que o início do processo de oxidação dos grupos fenólicos ocorre através da difusão de espécies eletroativas da solução para a superfície do eletrodo [113].

De modo a verificar a influência do pH no comportamento voltamétrico do estriol, variou-se o pH de 2,0 a 8,0 e os dados obtidos nesse estudo estão apresentados na Figura 24.

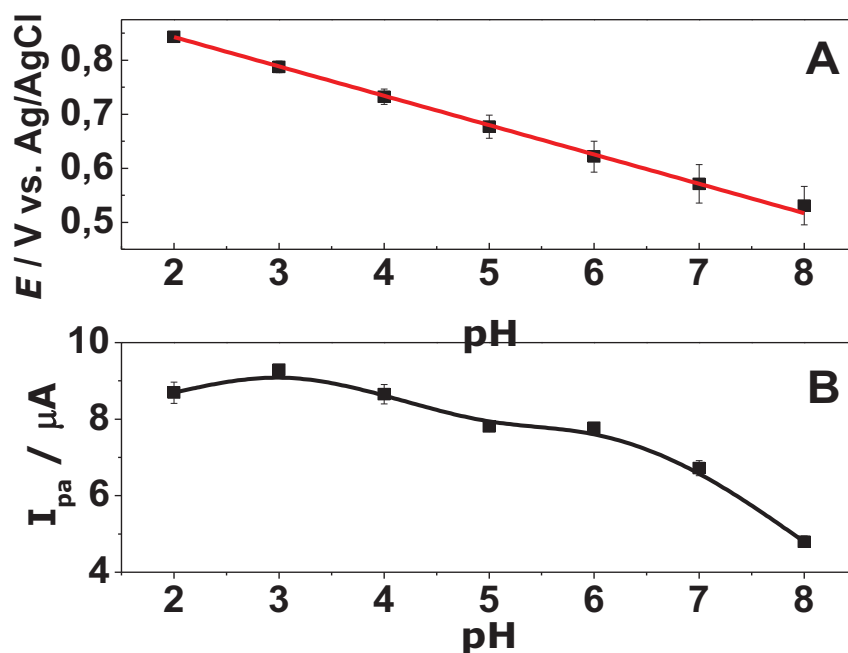


Figura 24. Influência do pH nos valores de potencial de oxidação do estriol (A) e pico de corrente (B) na presença de estriol $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($n = 3$) em solução de tampão acetato $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ e etanol (1:1) em pH 5,0. GCE/CNT foi utilizado como eletrodo de trabalho. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

Na Figura 24A, pode-se observar um deslocamento do potencial de oxidação com o aumento do pH, sendo esse um comportamento típico já observado na literatura [109,54,133] para a oxidação de compostos estrogênicos fenólicos. Essa diminuição no potencial de oxidação com o aumento do pH pode ser explicado com base na reação de oxidação proposta para o estriol (Figura 21). Com a diminuição de íons H^+ presentes na célula eletroquímica, ocorre um favorecimento na formação dos produtos, sendo necessário o fornecimento de uma menor quantidade de energia para que a reação ocorra, resultando em menores valores de potencial de oxidação com o aumento do pH.

A equação linear que relaciona o pico de oxidação e o pH é $E / \text{mV} = 944,8 - 52,87 \text{ pH}$ ($r^2 = 0,998$) e o coeficiente angular próximo ao valor de 59 mV indica a transferência de um número igual de prótons e elétrons durante a reação de oxidação do estriol. Além disso, na Figura 24B, é possível observar maiores valores de corrente entre pH 2,0 e 4,0 seguido de um posterior decréscimo para valores de pH mais altos.

Os valores de corrente para pH 3,0 apresentaram menores valores de desvio padrão, decorrentes dos picos de oxidação com maior resolução, sendo esse o valor de pH escolhido para as medidas amperométrica posteriores.

4.3 DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO UTILIZANDO μ TED COM ELETRODO IMPRESSO DE CARBONO MODIFICADO

Visando a aplicação do eletrodo impresso de carbono (SPCE) como detector amperométrico no sistema μ TED, o comportamento eletroquímico do estriol foi estudado em um sistema convencional de três eletrodos. O comportamento observado utilizando o SPCE não modificado e modificado com CNTs funcionalizados foi similar ao comportamento obtido utilizando os eletrodos de carbono vítreo, sendo os dados obtidos apresentados na Figura 25.

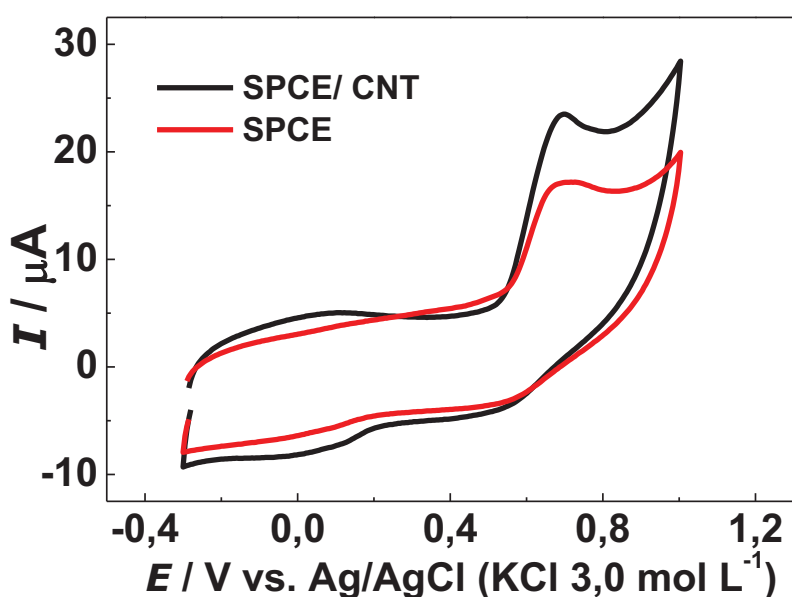


Figura 25. Voltamogramas cíclicos comparativos utilizando o SPCE e o SPCE/CNT como eletrodos de trabalho. Os voltamogramas foram obtidos na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de estriol, em solução de acetato e etanol $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ (1:1) em pH 3,0. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

O aumento de aproximadamente duas vezes nos valores de corrente de pico em $0,70 \text{ V}$, quando utilizado o SPCE/CNT como eletrodo de trabalho, sugere a grande potencialidade analítica do uso deste eletrodo para a determinação de estriol. Vários parâmetros relacionados ao dispositivo como a diferença de altura entre os reservatórios, número de fios de algodão utilizados como canais, foram selecionados baseados em trabalhos previamente relatados na literatura [32].

A resposta amperométrica é fortemente influenciada pelos microcanais, zona de detecção, dimensões do dispositivo e a injeção da amostra. Sendo assim, foram escolhidas as seguintes condições experimentais: nove fios de

barbante de algodão arranjados em paralelo para obtenção dos canais microfluídicos, diferença de altura de 52 mm entre os reservatórios de entrada e de saída, 10 mm de distância entre o local de injeção de amostra e a zona de detecção, segundo o descrito por Agustini e colaboradores [32]. O eletrodo impresso modificado foi utilizado juntamente com o μ TED proposto e as medidas amperométricas foram realizadas utilizando uma solução mista de ácido acético e etanol, na proporção 1:1 em pH 3,0, como eletrólito suporte.

Visando investigar a vazão do eletrólito suporte no dispositivo empregado, a massa do reservatório de saída foi monitorada, como já descrito previamente, sendo os resultados apresentados na Figura 26.

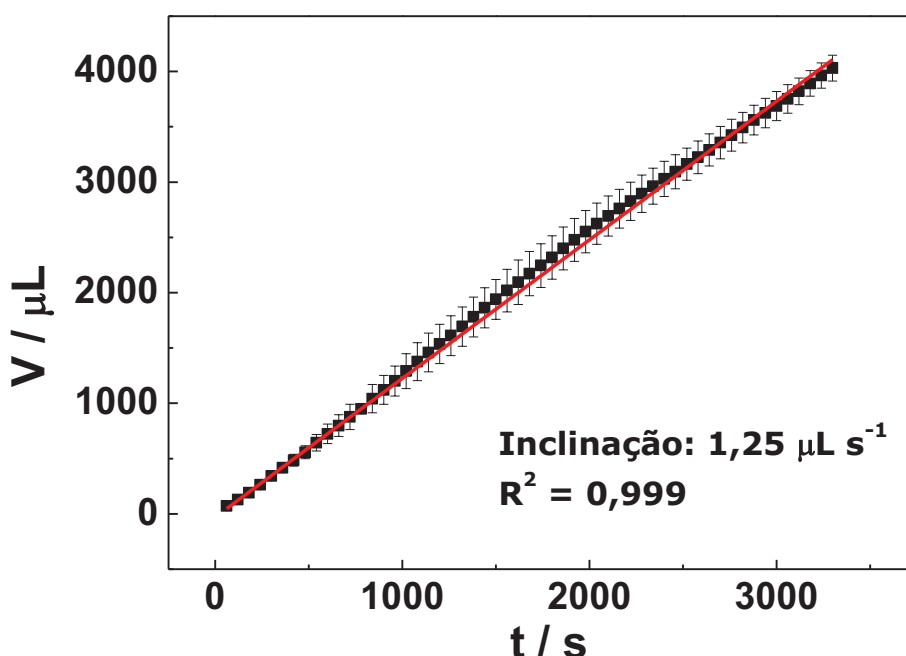


Figura 26. Relação entre volume de solução que flui pelo μ TED em função do tempo ($n = 3$). O coeficiente angular representa a vazão da solução e o R^2 é o coeficiente de determinação.

Dentre os diversos fatores que afetam a vazão do sistema, tem-se o nível de solução do reservatório de entrada, o número de fios de algodão utilizados para formar os canais, a diferença de altura entre os reservatórios de entrada e saída, entre outros. O reservatório de entrada foi preenchido pequenos volumes do eletrólito suporte a cada minuto do experimento, de modo a manter constante o nível do reservatório de entrada. Com base nos resultados, é possível verificar que houve um aumento linear do volume de solução com o aumento do tempo,

indicando um fluxo contínuo e livre de oscilações significativas por pelo menos 55 minutos ($r^2 = 0,999$). A vazão encontrada para esse sistema foi de $1,25 \mu\text{L s}^{-1}$, que está em concordância com ensaios analíticos semelhantes em fluxo [6, 31,57].

Para verificar a influência do volume de injeção na resposta amperométrica e na frequência analítica, variou-se o volume das amostras injetadas de 0,5 a 2,5 μL , sendo os resultados apresentados na Figura 27.

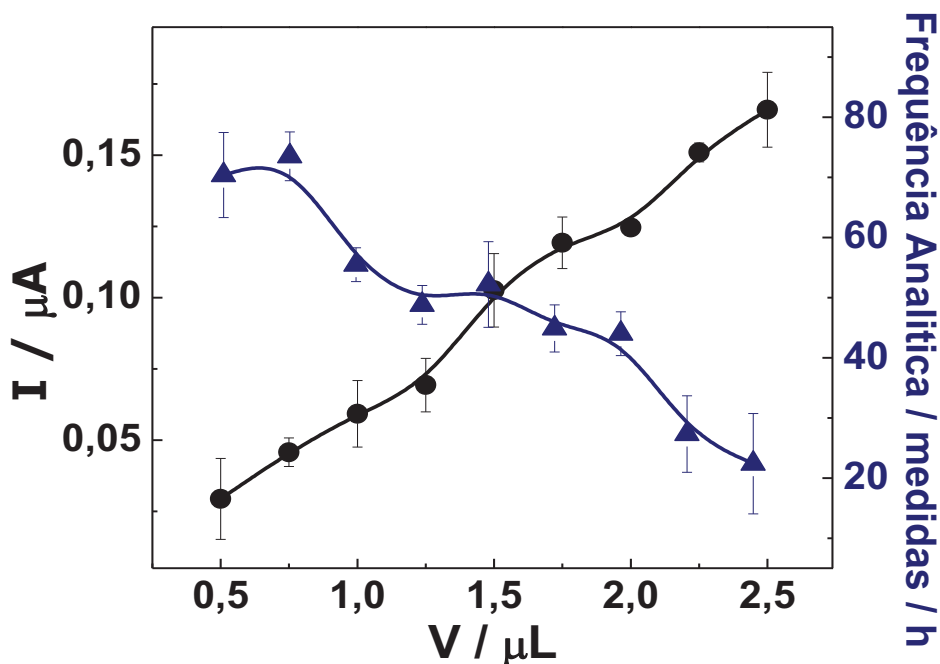


Figura 27. Resposta amperométrica (●) e frequência analítica (▲) em função do volume de injeção de estriol utilizando SPCE/CNT. Respostas obtidas injetando alíquotas de solução $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de estriol, utilizando solução de acetato e etanol 0,25 mol (1:1) em pH 3,0 como eletrólito suporte ($n = 3$). $E_{\text{aplicado}} = 0,75 \text{ V}$.

Observou-se que com o aumento do volume de injeção ocorreu um aumento na resposta amperométrica, provavelmente devido à menor dispersão sofrida pela amostra com o aumento do volume injetado. Embora tenham sido observados maiores valores de corrente para os maiores volumes de solução de estriol, pode-se observar também uma diminuição da frequência analítica com o aumento do volume, isso ocorre devido ao maior tempo de limpeza entre cada injeção.

O tempo de limpeza entre medidas foi verificado pelo tempo necessário para que a resposta de uma injeção não interferisse na resposta da posterior, sendo isso observado pela similaridade dos valores de corrente de pico para uma

mesma concentração. Volumes de injeção maiores que 2,5 μL apresentaram desvios mais elevados provavelmente pela possibilidade de vazamento durante a etapa de injeção, em que os fios de algodão não suportaram grandes volumes de injeção. Portanto, o valor de 2,0 μL foi considerado adequado para as medidas amperométricas posteriores, devido à sensibilidade considerável, ao baixo valor de desvio padrão (2,4% para cinco medidas), indicando maior precisão e frequência analítica de 44 medidas por hora, comparável a apresentada por outros autores [32].

A influência do potencial aplicado foi estudada variando-se o potencial de 0,60 a 0,90 V. Os gráficos obtidos que relacionam corrente de pico e o potencial aplicado e o amperograma contendo os sinais transientes para cada potencial estão apresentados na Figura 28A e 28B, respectivamente.

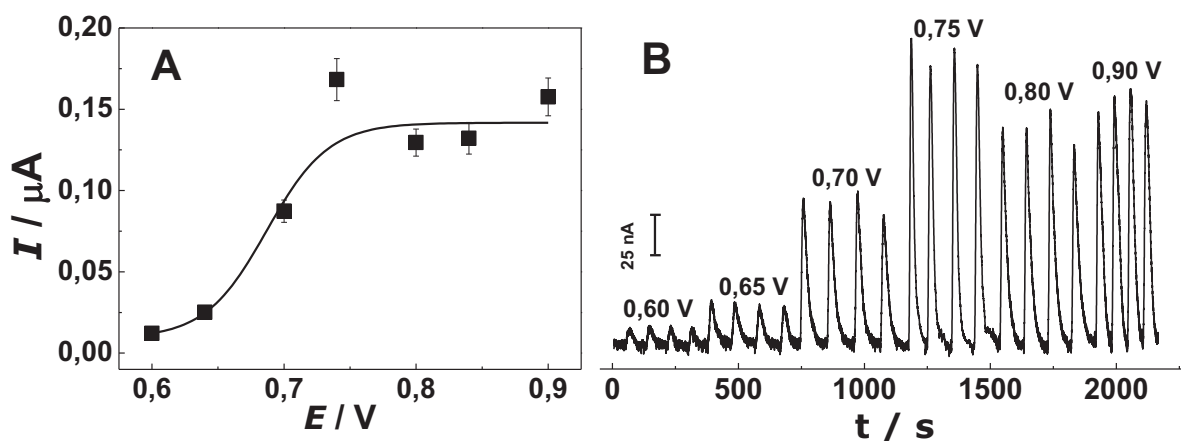


Figura 28. (A) Variação dos valores de corrente de pico obtidos a partir de amperogramas gerados utilizando o μTED , aplicando-se potenciais que variaram de 0,60 – 0,90 V. Cada ponto representa a resposta média para 10 adições consecutivas. (B) Respostas amperométricas obtidas referentes às injeções de alíquotas de 2,0 μL de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de estriol, variando-se o potencial de 0,60 a 0,90 V, com uma vazão de $1,25 \mu\text{Ls}^{-1}$.

O aumento nos valores de corrente de pico foi observado até o potencial de 0,75 V, seguida da posterior estabilização da corrente de pico para potenciais mais elevados. O valor de 0,75 V está em concordância com o comportamento voltamétrico observado para o estriol, como pode ser observado na Figura 20, sendo este o potencial de pico anódico. Para potenciais mais elevados, houve uma variação no ruído da linha base, fator que interfere na sensibilidade das medidas e que pode ser relacionado com a formação de gases na superfície do

eletrodo, promovidas pelos altos valores de potencial, como a formação de oxigênio resultante da oxidação do eletrólito/solvente. O potencial que apresentou melhor relação sinal ruído foi 0,75 V, sendo esse o potencial escolhido para as posteriores medidas.

A repetibilidade e a reprodutibilidade da resposta do dispositivo proposto foram avaliadas realizando-se nove injeções sucessivas de alíquotas de 2,0 μL de estriol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, sendo os resultados apresentados na Figura 29.

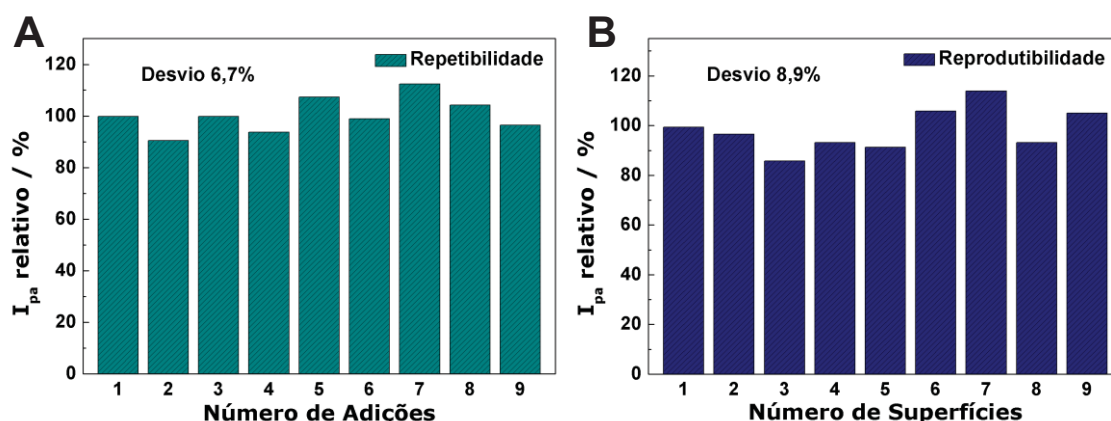


Figura 29. Respostas amperométricas relativas obtidas utilizando o μTED , utilizando uma mesma superfície (A) e diferentes superfícies (B). Respostas referentes às injeções de alíquotas de 2,0 μL de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de estriol, com uma vazão de $1,25 \mu\text{L s}^{-1}$. Potencial aplicado: 0,75 V.

Para a reprodutibilidade, foram utilizados eletrodos impressos e fios de algodão diferentes entre cada medida. O desvio padrão das injeções para os estudos de repetibilidade e reprodutibilidade foram 6,7 e 8,9%, respectivamente. Os baixos valores de desvio indicam uma repetibilidade satisfatória, confirmando que em condições de fluxo contínuo não há efeitos de passivação significativos da superfície e que mesmo variando-se as superfícies utilizadas no estudo de reprodutibilidade, as respostas são concordantes.

As respostas amperométricas foram obtidas variando-se a concentração das soluções padrão de estriol injetadas no dispositivo proposto. Os resultados referentes a esse estudo estão apresentados na Figura 30.

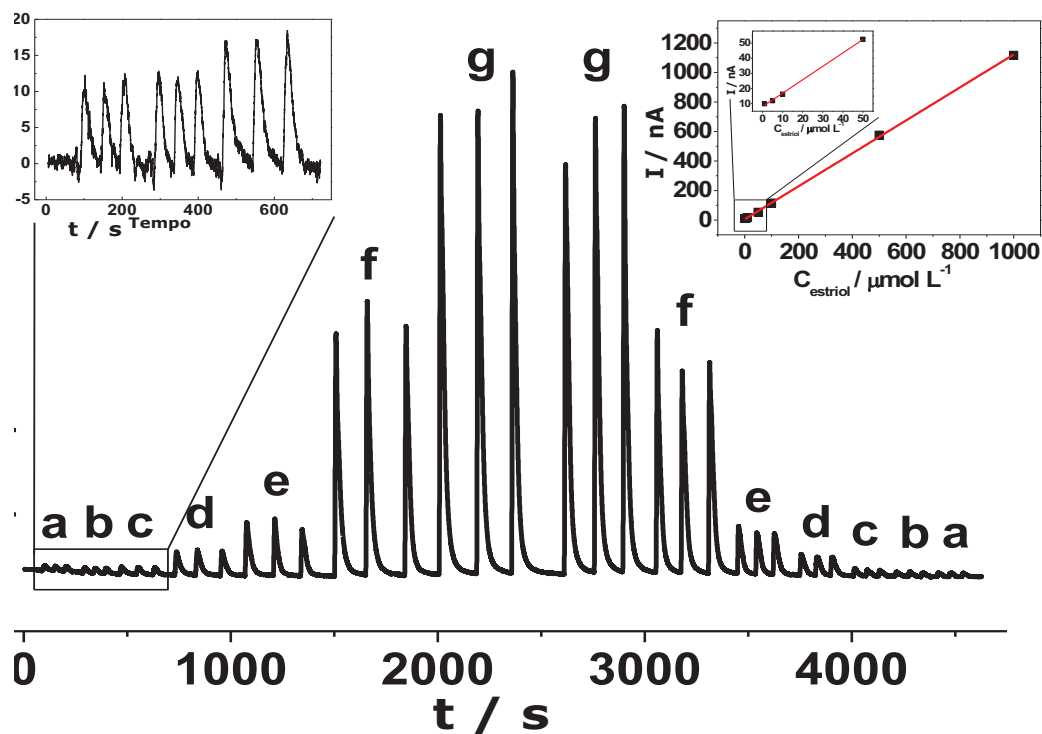


Figura 30. Sucessivas respostas amperométricas obtidas utilizando o μ TED referentes às injeções de alíquotas de 2,0 μ L de soluções padrão de estriol, variando de (a) 1,0; (b) 5,0; (c) 10,0; (d) 50,0; (e) 100,0; (f) 500,0 e (g) 1000,0 μ mol L⁻¹, com uma vazão de 1,25 μ L s⁻¹. Potencial aplicado: 0,75 V. Curva analítica referente às respostas amperométricas obtidas utilizando o μ TED (a direita superior). Cada ponto é o valor médio entre 6 injeções para cada concentração.

A concentração de estriol foi variada de 1,0 a 1000 μ mol L⁻¹, sendo feitas três injeções consecutivas para cada concentração. De modo a verificar a tendência de envenenamento da superfície do μ TED, a concentração de estriol foi injetada partindo da concentração mínima para a máxima e voltando da máxima para a mínima. A curva analítica obtida está apresentada em detalhe na Figura 30. O μ TED apresentou uma sensibilidade de 1,13 nA L μ mol⁻¹ e uma correlação linear satisfatória ($r^2 = 0,992$). A faixa linear abrangida pelo método proposto foi de 1,0 – 1000 μ mol L⁻¹ de estriol e o limite de detecção (LOD, três vezes o desvio padrão (SD) da linha base/ inclinação) foi estimado em 0,53 μ mol L⁻¹ e o de quantificação (LOQ, dez vezes o desvio padrão (SD) da linha base/ inclinação) foi de 1,77 μ mol L⁻¹. Uma frequência analítica de 44 injeções por hora foi obtida, devido ao transporte eficiente do analito até o detector e devido ao período de tempo curto necessário até ocorrer à limpeza do sensor.

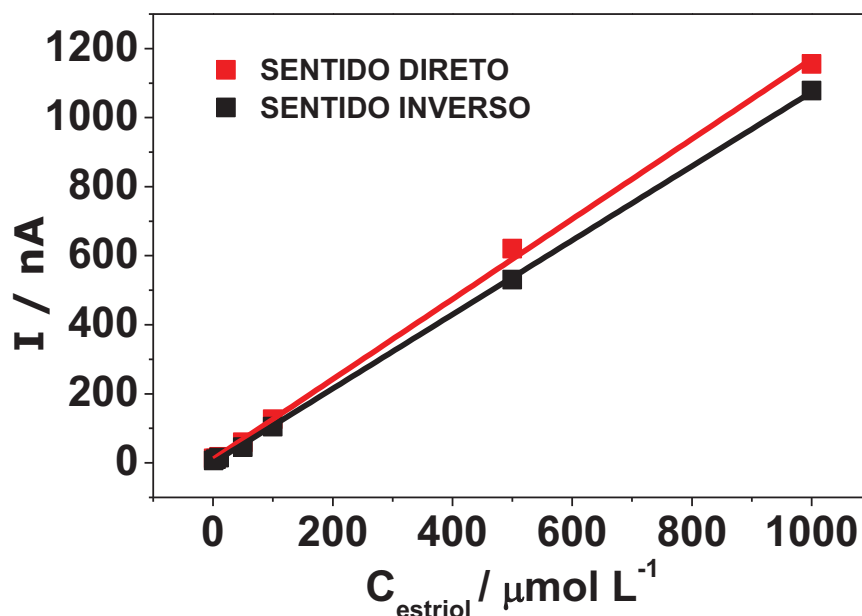


Figura 31. Curvas analíticas referentes às injeções no sentido direto (concentrações menores para as maiores) e sentido inverso (concentrações maiores para as menores).

Além do aumento de corrente em função da concentração de estriol, pode-se observar que para as mesmas concentrações os sinais transientes permaneceram muito similares, visto que as inclinações das curvas analíticas referentes ao sentido direto e ao inverso foram muito similares, como pode-se observar na Figura 31. Diferentemente do ocorrido no sistema estático, conclui-se que não ocorreu um envenenamento significativo da superfície do eletrodo, mesmo após a injeção de elevadas concentrações do analito. A limpeza contínua feita pela passagem do eletrólito carregador e os baixos volumes utilizados possibilitaram a minimização desse efeito de passivação da superfície, sendo esse efeito de limpeza relatado na literatura [137].

Os resultados obtidos com o dispositivo proposto neste trabalho confirmam o excelente desempenho analítico do sistema microfluídico combinado com o SPCE descrito neste trabalho. Para fins comparativos, as figuras de mérito obtidas para o sensor proposto estão apresentadas na Tabela 2 juntamente com os parâmetros analíticos obtidos por vários autores utilizando diferentes metodologias analíticas para a determinação de estriol.

Tabela 2. Características gerais dos métodos eletroquímicos utilizados para a determinação de estriol.

Eletrodo	Técnica	LDR (mol L ⁻¹)	LOD (mol L ⁻¹)	Ref
GCE/Pt/MWCNTs	SWV	1,0 x 10 ⁻⁶ – 7,5 x 10 ⁻⁵	6,2 x 10 ⁻⁷	[16]
GCE/rGO–SbNPs	DPV	2,0 x 10 ⁻⁷ – 1,4 x 10 ⁻⁶	5,0 x 10 ⁻¹⁰	[4]
BDDE	SWV	2,0 x 10 ⁻⁷ – 2,0 x 10 ⁻⁵	1,7 x 10 ⁻⁷	[1]
GCE/Lac/rGO/Sb ₂ O ₅	Amperometria	2,5 x 10 ⁻⁸ – 1,03 x 10 ⁻⁶	1,1 x 10 ⁻⁸	[21]
SPCE/MWCNT	Amperometria em Fluxo	1,0 x 10 ⁻⁶ – 1,0 x 10 ⁻³	5,3 x 10 ⁻⁷	*

Pt/MWCNTs/GCE: Eletrodo modificado com compósito de nanoclusters de platina e nanotubos de carbono multi-parede; SWV: voltametria de onda quadrada; rGO – SbNPs: compósito de óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de antimônio; DPV: voltametria de pulso diferencial; BDDE: eletrodo de diamante dopado com boro; Lac/rGO/Sb₂O₅: filme de óxido de antimônio (Sb₂O₅) dopado com óxido de grafeno reduzido com enzima lacase imobilizada. *Presente trabalho.

4.4 ANÁLISE DA AMOSTRA FARMACÊUTICA

A metodologia eletroanalítica proposta foi aplicada para a determinação de estriol em uma amostra farmacêutica comercial. As respostas amperométricas referentes às injeções das soluções padrão de estriol e das amostras comerciais estão apresentadas na Figura 31.

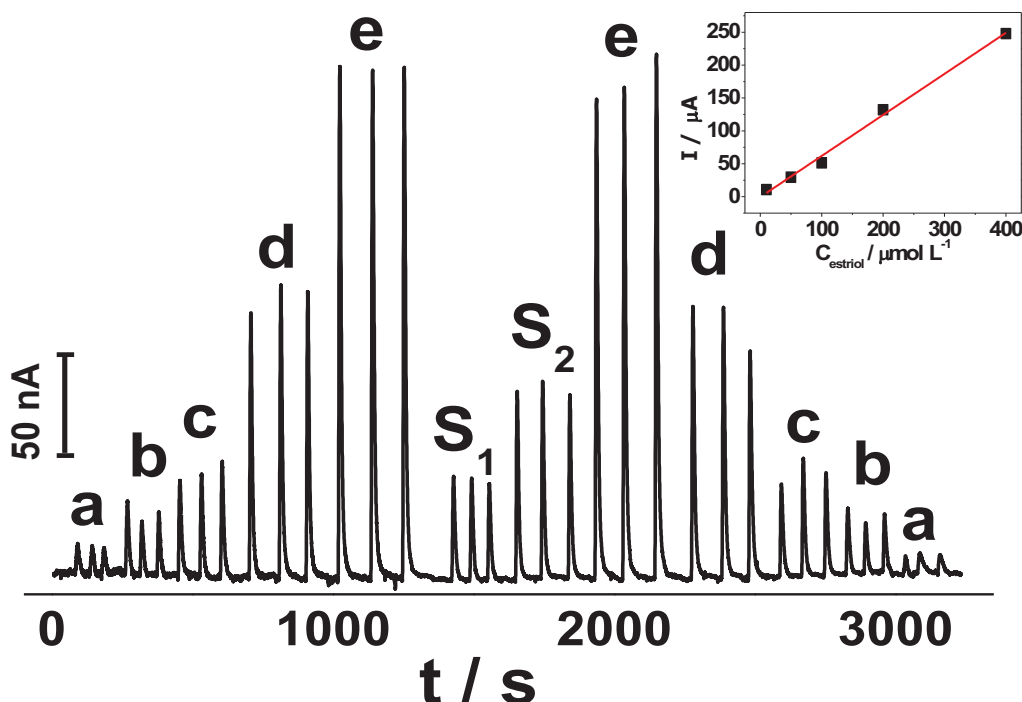


Figura 32. Sucessivas respostas amperométricas obtidas utilizando o μ TED referentes às injeções de alíquotas de 2,0 μ L de soluções padrão de estriol, variando de (a) 10,0; (b) 50,0; (c) 100,0; (d) 200,0 e (e) 400 μ mol L⁻¹ e duas amostras farmacêuticas (S₁ e S₂), com uma vazão de 1,25 μ Ls⁻¹. Potencial aplicado: 0,75 V. A curva analítica obtida em detalhe.

Para verificar a possibilidade de interferentes presentes nas amostras farmacêuticas, como amido, lactose, estearato de magnésio e amilopectina [109], duas diferentes amostras farmacêuticas foram preparadas e utilizadas neste estudo. Uma amostra farmacêutica foi preparada de modo a conter somente uma quantidade de amostra comercial (S₁) e outra foi preparada contendo, além da amostra comercial (S₂), uma quantidade adicional do padrão de estriol. Ambas as preparações farmacêuticas continham a mesma quantidade de estriol proveniente da amostra comercial. Os valores obtidos para ambas as amostras foram comparados e valores de recuperação foram obtidos, variando de 92,9 a 104,7%. Os resultados obtidos sugerem que o estriol pode ser determinado com sucesso em formulações farmacêuticas utilizando o sistema μ TED, sem um significativo efeito de interferência de matriz, sendo esse um efeito já relatado na literatura [109].

Um procedimento espectrofotométrico foi realizado como método comparativo para a determinação de estriol, como recomendado pela

Farmacopeia Europeia [127]. As medidas espectrofotométricas foram realizadas em etanol, em 281 nm. A curva analítica apresentou boa linearidade ($R^2 = 0,999$) e a determinação de estriol foi feita na amostra farmacêutica, resultando em uma concentração de estriol de 1,10 mg / comprimido. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 3. Valores de concentração de estriol obtidos a partir do método espectrofotométrico comparativo.

Tabelado (mg / comp)	Experimental (mg / comp)	Referência (mg / comp)	E_r1 / %*	E_r2 / %**
1,0	1,11	1,10	+ 10,7	+ 0,8

E_r1: erro relativo entre o resultado obtido pelo método proposto e o valor tabelado;
E_r2: erro relativo entre o resultado obtido pelo método proposto e o obtido pelo método comparativo.

O método proposto empregando o sistema microfluídico forneceu um valor de estriol de $1,11 \pm 0,04$ mg / comprimido, apresentando um erro relativo de 10,7 % com o valor tabelado (E_r1) e um erro relativo de 0,8% comparado com o método comparativo realizado (E_r2), sendo ambos os resultados considerados concordantes, com 95% de confiança (teste-t). A similaridade da concentração de estriol determinada pelo método de referência e pelo proposto indica a excelente confiabilidade do método proposto neste trabalho.

5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostram, pela primeira vez na literatura, o uso de eletrodos impressos de carbono modificados combinados com um sistema microfluídico μ TED na determinação amperométrica de estriol. Além disso, o sistema apresentou-se com uma ferramenta promissora na determinação de estriol e pode ser utilizado em determinações diretas em amostras farmacêuticas, não necessitando de pré-tratamento. Um excelente desempenho analítico foi observado, devido ao baixo limite de detecção, boa sensibilidade e alta estabilidade do sensor desenvolvido. O procedimento proposto apresentou resultados promissores, podendo ser utilizado como uma alternativa no desenvolvimento de novos sensores utilizando os sistemas microfluídicos baseados em fios de algodão para a determinação de diversas moléculas de interesse ambiental, biológico, clínico, entre outros.

6 REFERÊNCIAS

- [1] WHITESIDES, G.M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 368–373, jul. 2006.
- [2] REYES, D.R.; IOSSFIDIS, D.; AUROUX, P.; MANZ, A. Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 12, p. 2623–2636, mai. 2002.
- [3] KARIMI, M.; BAHRAMI, S.; MIRSHEKARI, H.; BASRI, S.M.M.; NIK, A.B.; AREF, A.R.; AKBARI, M.; HAMBLIN, M.R. Microfluidic systems for stem cell-based neural tissue engineering. **Lab Chip**, v. 16, n. 14, p. 2551–2571, jun. 2016.
- [4] BLAUDECK, T.; ADNER, D.; HERMANN, S.; LANG, H.; GESSNER, T.; SCHULZ, S.E. Wafer-level decoration of carbon nanotubes in field-effect transistor geometry with preformed gold nanoparticles using a microfluidic approach. **Microelectronic Engineering**, v. 137, p. 135–140, abr. 2015.
- [5] KIM, J.; ELSNAB, J.; GEHRKE, C.; LI, J.; GALE, B.K. Microfluidic integrated multi-walled carbon nanotube (MWCNT) sensor for electrochemical nucleic acid concentration measurement. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 185, p. 370–376, ago. 2013.
- [6] LEI, K.F.; LEE, K.F.; YANG, S.I. Fabrication of carbon nanotube-based pH sensor for paper-based microfluidics. **Microelectronic Engineering**, v. 100, p. 1–5, dez. 2012.
- [7] DUFFY, D.C.; MCDONALD, J.C.; SCHUELLER, O.J.A.; WHITESIDES, G.M. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 23, p. 4974–4984, out. 1998.
- [8] ZHAO, X.; DONG, T.; PIRES, N.; YANG, Z.; HJELSETH, S. Ultra-sensitive microfluidic system based on IMRAMP assay to quantify hormones in blood. 4th International Conference on Biomedical Engineering and Informatics (BMEI), Shanghai, p. 1192–1195, 2011.
- [9] BAKER, C.A.; DUONG, C.T.; GRIMLEY, A.; ROPER, M.G. Recent advances in microfluidic detection systems. **Bioanalysis**, v. 1, n. 5, p. 967–975, ago. 2009.
- [10] GUVEN, S.; LINDSEY, J.S.; POUDEL, I.; CHINTHALA, S.; NICKERSON, M.D.; GERAMI-NAINI, B.; GURKAN, U.A.; ANCHAN, R.M.; DEMIRCI, U. Functional Maintenance of Differentiated Embryoid Bodies in Microfluidic Systems: A Platform for Personalized Medicine. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 4, n.3, p. 261–268, fev. 2015.
- [11] ROPER, M.G.; SHACKMAN, J.G.; DAHLGREN, G.M.; KENNEDY, R.T. Microfluidic Chip for Continuous Monitoring of Hormone Secretion from Live Cells Using an Electrophoresis-Based Immunoassay. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 18, p. 4711–4717, ago. 2003.

- [12] JANASEK, D.; FRANZKE, J.; MANZ, A. Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems. **Nature**, v. 442, p. 374-380, jul. 2006.
- [13] REN, K.; ZHOU, J.; WU, H. Materials for Microfluidic Chip Fabrication. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 11, p. 2396–2406, jun. 2013.
- [14] LISOWSKI, P.; ZARZYCKI, P.K. Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (μ PADs) and Micro Total Analysis Systems (μ TAS): Development, Applications and Future Trends. **Chromatographia**, v. 76, n. 19, p. 1201–1214, out. 2013.
- [15] MARTINEZ, A.W.; PHILLIPS, S.T.; WHITESIDES, G.M.; CARRILHO, E. Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 3–10, dez. 2010.
- [16] BALAGADDÉ, F. K.; YOU, L.; HANSEN, C. L.; ARNOLD, F. H.; QUAKE, S. R. Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. **Science**, v. 309, n. 5731, p. 137–140, jul. 2005.
- [17] WEIBEL, D.B.; KRUIHOF, M.; POTENTA, S.; SIA, S.K.; LEE, A.; WHITESIDES, G.M. Torque-Actuated Valves for Microfluidics. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 15, p. 4726–4733, jun. 2005.
- [18] XIA, Y.; SI, J.; LI, Z. Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 77, p. 774–789, mar. 2016.
- [19] CATE, D.M.; ADKINS, J.A.; METTAKOONPITAK, J.; HENRY, C.S. Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices. *Analytical Chemistry*, v. 87, n. 1, p. 19–41, nov. 2015.
- [20] REN, K.; ZHOU, J.; WU, H. Materials for Microfluidic Chip Fabrication. *Accounts of Chemical Research*, v. 46, n. 11, p. 2396–2406, jun. 2013.
- [21] YAMADA, K.; HENARES, T.G.; SUZUKI, K.; CITTERIO, D. Paper-Based Inkjet-Printed Microfluidic Analytical Devices. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, n. 18, p. 5294–5310, abr. 2015.
- [22] MARTINEZ, A.W.; PHILLIPS, S.T.; CARRILHO, E.; THOMAS, S.W.; SINDI, H.; WHITESIDES, G.M. Simple Telemedicine for Developing Regions: Camera Phones and Paper-Based Microfluidic Devices for Real-Time, Off-Site Diagnosis. **Analytical Chemistry**, n. 80, v. 10, p. 3699-3707, abr. 2008.
- [23] BALLERINI, D.R.; LI, X.; SHEN, W. Patterned paper and alternative materials as substrates for low-cost microfluidic diagnostics. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 13, n. 5, p. 769–787, nov. 2012.
- [24] Estrogen and Progestin (Hormone Replacement Therapy). Disponível em: <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a601041.html>>, acesso em 14/04/2015.

- [25] WEI, Y.C.; FU, L.M.; LIN, C.H. Electrophoresis separation and electrochemical detection on a novel thread-based microfluidic device. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 14, n. 3, p. 583–590, out. 2013.
- [26] SHIDDIKY, M.J.A.; YOON-BO S. Trace Analysis of DNA: Preconcentration, Separation, and Electrochemical Detection in Microchip Electrophoresis Using Au Nanoparticles. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 10, p. 3724–3733, abr. 2007.
- [27] GUAN, W.; LIU, M.; ZHANG, C. Electrochemiluminescence detection in microfluidic cloth-based analytical devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 75, p. 247–253, jan. 2016.
- [28] MARTIN, R.S.; GAWRON, A.J.; LUNTE, S.M.; HENRY, C.S. Dual-Electrode Electrochemical Detection for Poly(dimethylsiloxane)-Fabricated Capillary Electrophoresis Microchips. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 14, p. 3196–3202, mai. 2000.
- [29] WANG, J. Electrochemical detection for microscale analytical systems: a review. **Talanta**, v. 56, n. 2, p. 223–231, fev. 2002.
- [30] JIN, G.P.; LIN, X.Q. Voltammetric behavior and determination of estrogens at carbamylcholine modified paraffin-impregnated graphite electrode. **Electrochimica Acta**, v. 50, n. 16–17, p. 3556–3562, mai. 2005.
- [31] RECHES, M.; MIRICA, K.A.; DASGUPTA, R.; DICKEY, M.D.; BUTTE, M.J.; WHITESIDES, G.M. Thread as a Matrix for Biomedical Assays. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 2, n. 6, p. 1722–1728, mai. 2010.
- [32] AGUSTINI, D.; BERGAMINI, M.F.; MARCOLINO-JUNIOR, L.H. Low cost microfluidic device based on cotton threads for electroanalytical application. **Lab Chip**, v. 16, n. 2, p. 345–352, nov. 2016.
- [33] PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, ago. 2013.
- [34] SKOOG, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. Fundamentos de Química Analítica. Cengage Learning, 2010, São Paulo.
- [35] ALEIXO, L.M. Voltametria: Conceitos e Técnicas. Disponível em: <<http://ishtar.iqm.unicamp.br/downloads/chemkeys/voltametria-vf.pdf>>, acesso em 16/01/2017.
- [36] BARD, A.J.; FAULKNER, L.R. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications. John Wiley & Sons, Inc., 2001, New York.
- [37] ROUSSEL, T.J.; JACKSON, D.J.; BALDWIN, R.P.; KEYNTON, R.S. Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics. In D. Li, ed. Boston, MA: Springer US, 2008, p. 39–47.

- [38] CHRISTIAN, G. Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Inc., 2004, New York.
- [39] ADELOJU, S.B. Amperometry. Encyclopedia of Analytical Science, Elsevier Press, 2005.
- [40] STRADIOTTO, N.R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M.V.B. Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 159-173, mar./abr. 2003.
- [41] CERDÀ, V.; FERRER, L.; AVIVAR, J.; CERDÀ, A. Flow Injection Analysis: A Practical Guide. Elsevier Science, 2012,
- [42] CHAILAPAKUL, O.; NGAMUKOT, P.; YOOSAMRAN, A.; SIANGPROH, W.; WANGFUENGKANAGUL, N. Recent Electrochemical and Optical Sensors in Flow-Based Analysis. **Sensors**, v. 6, p.1383–1410, out. 2006.
- [43] SANTOS, W.T.P.; GIMENES, D.T.; RICHTER, E.M.; ANGNES, L. Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: potencialidades e aplicações. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1753–1761, mai. 2011.
- [44] KARIMI, M.; BAHRAMI, S.; MIRSHAKARI, H.; BASRI, S.M.M.; NIK, A.B.; AREF, A.R.; AKBARI, M.; HAMBLIN, M.R. Microfluidic systems for stem cell-based neural tissue engineering. **Lab Chip**, v. 16, n. 14, p. 2551–2571, jun. 2016.
- [45] RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. Flow Injection Analysis. Part 1. A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, n. 78, p. 145 – 157, fev. 1975.
- [46] FANJUL-BOLADO, P.; LAMAS-ARDISANA, P.J.; HERNÁNDEZ-SANTOS, D.; COSTA-GARCÍA, A. Electrochemical study and flow injection analysis of paracetamol in pharmaceutical formulations based on screen-printed electrodes and carbon nanotubes. **Analytica Chimica Acta**, v. 638, n. 2, p. 133–138, abr. 2009.
- [47] LIU, G.; LIN, Y. Biosensor Based on Self-Assembling Acetylcholinesterase on Carbon Nanotubes for Flow Injection/Amperometric Detection of Organophosphate Pesticides and Nerve Agents. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 3, p. 835–843, jan. 2006.
- [48] ERTEK, B.; DILGIN, Y. Photoamperometric flow injection analysis of glucose based on dehydrogenase modified quantum dots-carbon nanotube nanocomposite electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 112, p. 138–144, dez. 2016.
- [49] WISITSORAAT, A.; SRITONGKHAM, P.; KARUWAN, C.; PHOKHARATKUL, D.; MATUROS, T.; TUANTRANONT, A. Fast cholesterol detection using flow injection microfluidic device with functionalized carbon nanotubes based electrochemical sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 4, p. 1514–1520. mai. 2010.

- [50] LOURENCAO, B.C.; MEDEIROS, R.A.; THOMASI, S.S.; FERREIRA, A.G.; ROCHA-FILHO, R.C.; FATIBELLO-FILHO, O. Amperometric flow-injection determination of the anthelmintic drugs ivermectin and levamisole using electrochemically pretreated boron-doped diamond electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 222, p. 181–189, jan. 2016.
- [51] DE CARVALHO, R.M.; FREIRE, R.S.; RATH, S.; KUBOTA, L.T. Effects of EDTA on signal stability during electrochemical detection of acetaminophen. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 5, p.871–878, mar. 2004.
- [52] PAPOUCHADO, L.; SANDFORD, R.W.; PETRIE, G.; ADAMS, R.N. Anodic oxidation pathways of phenolic compounds Part 2. Stepwise electron transfers and coupled hydroxylations. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 65, n. 1, p. 275–284, out. 1975.
- [53] GATTRELL, M.; KIRK, D.W. A Study of Electrode Passivation during Aqueous Phenol Electrolysis. **Journal of Electrochemical Society**, v. 140, n. 4, p. 903–911, dez. 1993.
- [54] BATISTA, I.V.; LANZA, M.R.; DIAS, I.L.; TANAKA, S.M.; TANAKA, A.A.; SOTOMAYOR, M.D. Electrochemical sensor highly selective for estradiol valerate determination based on a modified carbon paste with iron tetrapyrrolineporphyrine. **Analyst**, v. 133, n. 12, p. 1692–1699, dez. 2008.
- [55] BAHADIR, E.B.; SEZGINTÜRK, M.K. Electrochemical biosensors for hormone analyses. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 62–71, jun. 2015.
- [56] ILES R.K.; KALLICHURN, H. What will be the Future Development of Electrochemical Biosensors for the Detection and Quantification of Biomarkers? **Journal of Bioengineering and Biomedical Science**, v. 2, p. 1–5, out. 2012.
- [57] RACKUS, D.G.; SHAMSI, M.H.; WHEELER, A.R. Electrochemistry, biosensors and microfluidics: a convergence of fields. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 15, p. 5320–5340, mai. 2015.
- [58] SAMEENOI, Y.; KOEHLER, K.; SHAPIRO, J.; BOONSONG, K.; SUN, Y.; COLLETT JR., J.; VOLCKENS, J.; HENRY, C.S. Microfluidic Electrochemical Sensor for On-Line Monitoring of Aerosol Oxidative Activity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 25, p. 10562–10568, mai. 2012.
- [59] DEDÍK, J.; JANOVCOVÁ, M.; DEJMKOVÁ, H.; BAREK, J.; PECKOVÁ, K. Utilization of Unmodified Screen-Printed Carbon Electrodes in Electroanalysis of Organic Compounds (An Overview). **Sensing in Electroanalysis**, v. 6, p. 129–138, 2011.
- [60] BULEANDRA, M.; RABINCA, A.A.; TACHE, F.; MOLDOVAN, Z.; STAMATIN, I.; MIHAILCIUC, C.; CIUCU, A.A. Rapid voltammetric detection of kojic acid at a multi-walled carbon nanotubes screen-printed electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 241, p. 406–412, mai. 2017

- [61] MOHAMED, H.M. Screen-printed disposable electrodes: Pharmaceutical applications and recent developments. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 1–11, jan. 2016.
- [62] RENEDO, O.D.; ALONSO-LOMILLO, M.A.; MARTÍNEZ, M.J.A. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. **Talanta**, v. 73, n. 2, p. 202–219, set. 2007.
- [63] PELLICER, C.; GOMEZ-CABALLERO, A.; UNCETA, N.; GOICOLEA, M.A.; BARRIO, R.J. Using a portable device based on a screen-printed sensor modified with a molecularly imprinted polymer for the determination of the insecticide fenitrothion in forest samples. **Analytical Methods**, v. 2, n. 9, p.1280–1285, jun. 2010.
- [64] GODINO, N.; GORKIN III, R.; BOURKE, K.; DUCRÉE, J. Fabricating electrodes for amperometric detection in hybrid paper/polymer lab-on-a-chip devices. **Lab Chip**, v. 12, n. 18, p. 3281–3284, jun. 2012.
- [65] WANG, J.; TIAN, B.; NASCIMENTO, V.B.; ANGNES, L. Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks. **Electrochimica Acta**, v. 43, n. 23, p. 3459–3465, jul. 1998.
- [66] PARKASH, O.; YEAN, C.Y.; SHUEB, R.H. Screen Printed Carbon Electrode Based Electrochemical Immunosensor for the Detection of Dengue NS1 Antigen. **Diagnostics**, v. 4, n. 4, p.165–180, nov. 2014.
- [67] IWAMOTO, M.; TOKONAMI, S.; SHIIGI, H.; NAGAOKA, T. Activity enhancement of a screen-printed carbon electrode by modification with gold nanoparticles for glucose determination. **Research on Chemical Intermediates**, v. 35, n. 8, p. 919, out. 2009.
- [68] HART, J.P.; CREW, A.; CROUCH, E.; HONEYCHURCH, K.C.; PEMBERTON, R.M. Some Recent Designs and Developments of Screen-Printed Carbon Electrochemical Sensors/Biosensors for Biomedical, Environmental, and Industrial Analyses. **Analytical Letters**, v. 37. n. 5, p.789–830, ago. 2007.
- [69] HATADA, M.; TSUGAWA, W.; KAMIO, E.; LOEW, N.; KLONOFF, D.C.; SODE, K. Development of a screen-printed carbon electrode based disposable enzyme sensor strip for the measurement of glycated albumin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 88, p. 167–173, fev. 2017.
- [70] TENG, Y.; CHEN, T.; XU, F.; ZHAO, W.; LIU, W. Screen-printed Carbon Electrode Modified with Commercial Multilayer Graphene for Lead Detection in Soybean Sauces by Differential Pulse Stripping Voltammetry. **International Journal of Electrochemical Society**, v. 11, p. 1907–1917, fev. 2016.
- [71] CHIKAE, M.; IDEGAMI, K.; KERMAN, K.; NAGATANI, N.; ISHIKAWA, M.; TAKAMURA, Y.; TAMIYA, E. Direct fabrication of catalytic metal nanoparticles onto the surface of a screen-printed carbon electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 8, n. 8, p. 1375–1380, ago. 2006.

- [72] LIN, Y.; LU, F.; WANG, J. Disposable Carbon Nanotube Modified Screen-Printed Biosensor for Amperometric Detection of Organophosphorus Pesticides and Nerve Agents. **Electroanalysis**, v. 16, n. 1-2, p. 145–149, jan. 2004.
- [73] XIN, Y.; FU-BING, X.; HONG-WEI, L.; FENG, W.; DI-ZHAO, C.; ZHAO-YANG, W. A novel H₂O₂ biosensor based on Fe₃O₄-Au magnetic nanoparticles coated horseradish peroxidase and graphene sheets–Nafion film modified screen-printed carbon electrode. **Electrochimica Acta**, V. 109, p. 750–755, out. 2013.
- [74] YE, Y.; JU, H. Rapid detection of ssDNA and RNA using multi-walled carbon nanotubes modified screen-printed carbon electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 5, p. 735–741, nov. 2005.
- [75] MARTINS, P. Nanotecnologia e meio ambiente para uma sociedade sustentável. **Estudios sociales (Hermosillo, Son.)**, v. 17, n. 34, p. 293–311, dez. 2009.
- [76] National Nanotechnology Initiative. What is Nanotechnology? Disponível em: <<http://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition>>, acesso em 19/01/2017.
- [77] FEYNMAN, R.P. There's Plenty of Room at the Bottom. Disponível em: <http://media.wiley.com/product_data/excerpt/53/07803108/0780310853.pdf>, acesso em 19/01/2017.
- [78] TANIGUCHI, N. On The Basic Concept of 'Nano-Technology'. In: Proceedings of the International Conference on Production Engineering. Tokyo: Japan Society of Precision Engineering, v.10, p. 5–10, 1974.
- [79] WELCH, C.M.; COMPTON, R.G. The use of nanoparticles in electroanalysis: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 3, p. 601–619, fev. 2006.
- [80] YANG, G.; ZHU, C.; DU, D.; ZHU, J.; LIN, Y. Graphene-like two-dimensional layered nanomaterials: applications in biosensors and nanomedicine. **Nanoscale**, v. 7, n. 34, p. 14217–14231, jul. 2015.
- [81] ALIVISATOS, A. P. Perspectives on the Physical Chemistry of Semiconductor Nanocrystals. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 31, p. 13226–13239, ago. 1996.
- [82] BINDEWALD, E.H. **Construção e avaliação de um eletrodo modificado com nanocompósito de óxido de grafeno e nanopartículas de bismuto para determinação voltamétrica de chumbo e cádmio**. Dissertação de Mestrado (Química). Universidade Federal do Paraná, 2015.
- [83] CAO, G. Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications. **Imperial College Press**, 2004.
- [84] CHOPRA, N.; GAVALAS, V.G.; BACHAS, L.G.; HINDS, B. J.; BACHAS, L.G. Functional One-Dimensional Nanomaterials: Applications in Nanoscale Biosensors. **Analytical Letters**, v. 40, n. 11, p. 2067–2096, mai. 2007.

- [85] GOGOTSI, Y.; PRESSER, V. **Carbon Nanomaterials**, Second Edition. CRC Press, 2014.
- [86] IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 56–58, nov. 1991.
- [87] WILDGOOSE, G.G.; BANKS, C.E.; LEVENTIS, H.C.; COMPTON, R.G. Chemically Modified Carbon Nanotubes for Use in Electroanalysis. **Microchimica Acta**, v. 152, n. 3, p. 187–214, jan. 2006.
- [88] YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J.M.; RIU, J.; RIUS, F.X. Electrochemical sensing based on carbon nanotubes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 9, p. 939–953, out. 2010.
- [89] ARDUINI, F.; MICHELI, L.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G.; PIERMARINI, S.; RICCI, F.; VOLPE, G. Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 114–126, mai. 2016.
- [90] SOLTANI, N.; HADDADI, H.; ASGARI, M.; RAJABZADEH, N. Adsorptive stripping voltammetric detection of thorium on the multi-walled carbon nanotube modified screen printed electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 1212–1216, dez. 2015.
- [91] UPAN, J.; REANPANG, P.; CHAILAPAKUL, O.; JAKMUNEE, J. Flow injection amperometric sensor with a carbon nanotube modified screen printed electrode for determination of hydroquinone. **Talanta**, v. 146, p. 766–771, jan. 2016.
- [92] ZHENG, Q.; YANG, P.; XU, H.; LIU, J.; JIN, L. A simple and sensitive method for the determination of 4-n-octylphenol based on multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, p. 1717–1722, set. 2012.
- [93] ZHANG, X.; LI, C.; WANG, W.; XUE, J.; HUANG, Y.; YANG, X. A novel electrochemical immunosensor for highly sensitive detection of aflatoxin B1 in corn using single-walled carbon nanotubes/chitosan. **Food Chemistry**, v. 192, p. 197–202, fev. 2016.
- [94] GAO, C.; GUO, Z.; LIU, J.; HUANG, X. The new age of carbon nanotubes: An updated review of functionalized carbon nanotubes in electrochemical sensors. **Nanoscale**, v. 4, n. 6, p. 1948–1963, jan. 2012.
- [95] HUANG, S.H.; LIAO, H.H.; CHEN, D.H. Simultaneous determination of norepinephrine, uric acid, and ascorbic acid at a screen printed carbon electrode modified with polyacrylic acid-coated multi-wall carbon nanotubes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 10, p. 2351–2355, jun. 2010.
- [96] SUN, Y.; FU, K.; LIN, Y.; HUANG, W. Functionalized Carbon Nanotubes: Properties and Applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 12, p. 1096–1104, nov. 2002.

- [97] KUZMANY H, KUKOVECZ A, SIMON F, HOLZWEBER M, KRAMBERGER CH, PICHLER T. Functionalization of carbon nanotubes. **Synthetic Metals**, v. 141, n. 1–2, p. 113–22, ago. 2004.
- [98] BALASUBRAMANIAN, K.; BURGHARD, M. Chemically Functionalized Carbon Nanotubes. **Small**, v. 1, n. 2, p. 180–192, dez. 2005.
- [99] SABNA, V., THAMPI, S.G. & CHANDRAKARAN, S. Adsorption of crystal violet onto functionalised multi-walled carbon nanotubes: Equilibrium and kinetic studies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 134, Part 2, pp.390–397, dez. 2016.
- [100] DATSYUK, V.; KALYVA, M.; PAPAGELIS, K.; PARTHENIOS, J.; TASIS, D.; SIOKOU, A.; KALLITSIS, I.; GALIOTIS, C. Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. **Carbon**, v. 46, n. 6, p. 833–840, mai. 2008.
- [101] GUSMÃO, R.; MELLE-FRANCO, M.; GERALDO, D.; BENTO, F.; PAIVA, M.C.; PROENÇA, F. Probing the surface of oxidized carbon nanotubes by selective interaction with target molecules. **Electrochemistry Communications**, v. 57, p. 22–26, ago. 2015.
- [102] HWNANO Materials. Disponível em: <http://www.hwnanomaterial.com/high-quality-OH-and-COOH-functionalized-single-walled-carbon-Nanotubes-SWCNT_p388.html>, acesso em 21/01/2017.
- [103] REIS FILHO, R.W.; ARAÚJO, J.C.; VIEIRA, E.N. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817–822, abr. 2006.
- [104] Human Physiology/ The endocrine system. Disponível em: <<http://www.saylor.org/site/wp-content/uploads/2010/11/The-Endocrine-System.pdf>>, acesso em 10/04/2015.
- [105] YAKABE, C. **Determinação do 17 β -estradiol em formas farmacêuticas utilizadas na terapia de reposição hormonal**. Tese de Doutorado (Fármaco e Medicamento). Universidade de São Paulo, 2004.
- [106] PARDINI, D. Terapêutica de Reposição Hormonal na Osteoporose da Pós Menopausa. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 1999. 43: p.428-432.
- [107] CAMPIOLO, D.J.; MEDEIROS, S.F. Venous thromboembolism and hormonal replacement therapy in menopause: a clinical-epidemiological analysis. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 47, p. 534-542, out. 2003.

- [108] TANG, Y.; ZHAO, S.; WU, Y.; ZHOU, J.; LI, M. A direct competitive inhibition time-resolved fluoroimmunoassay for the detection of unconjugated estriol in serum of pregnant women. **Analytical Methods**, v. 5, n. 16, p. 4068–4073, jun. 2013.
- [109] SANTOS, K.D.; BRAGA, O.C.; VIEIRA, I.C.; SPINELL, A. Electroanalytical determination of estriol hormone using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 80, n. 5, p. 1999–2006, mar. 2010.
- [110] SURI, R.; HELLEMANN, G.; COHEN, L.; AQUINO, A.; ALTSHULER, L. Saliva Estriol Levels in Women with and Without Prenatal Antidepressant Treatment. **Biological Psychiatry**, v. 64, n. 6, p. 533–537, set. 2008.
- [111] TAYLOR, M. Unconventional estrogens: Estriol, biest, and triest. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 44, n. 4, p. 864–879, dez. 2001.
- [112] CESARINO, I.; CINCOTTO, F.H.; MACHADO, S.A.S. A synergistic combination of reduced graphene oxide and antimony nanoparticles for estriol hormone detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 210, p. 453–459, abr. 2015.
- [113] GAN, P.; COMPTON, R.G.; FOORD, J.S. The Voltammetry and Electroanalysis of Some Estrogenic Compounds at Modified Diamond Electrodes. **Electroanalysis**, v. 25, n. 11, p. 2423–2434, out. 2013.
- [114] CHEN, T.S.; HUANG, K.L. Effect of operating parameters on electrochemical degradation of estriol (E3). **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, p. 6343–6353, mai. 2013.
- [115] BECK, I.C.; BRUHN, R.; GANDRASS, J.; RUCK, W. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea. **Journal of Chromatography A**, v. 1090, n. 1–2, p. 98–106, out. 2005.
- [116] MATĚJÍČEK, D.; HOUSEROVÁ, P.; KUBÁŇ, V. Combined isolation and purification procedures prior to the high-performance liquid chromatographic-ion-trap tandem mass spectrometric determination of estrogens and their conjugates in river sediments. **Journal of Chromatography A**, v. 1171, n. 1–2, p. 80–89, nov. 2007.
- [117] LI, Z.; WANG, S.; LEE, N.A.; ALLAN, R.D.; KENNEDY, I.R. Development of a solid-phase extraction—enzyme-linked immunosorbent assay method for the determination of estrone in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 503, n. 2, p. 171–177, fev. 2004.
- [118] SU, P.; ZHANG, X.; WANG, Y.; CHANG, W. Direct immunoassay of estriol in pregnancy serum by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detector. **Talanta**, v. 60, n. 5, p. 969–975, jul. 2003.
- [119] FONSECA, A.P.; LIMA, D.L.D.; ESTEVES, V.I. Degradation by Solar Radiation of Estrogenic Hormones Monitored by UV–Visible Spectroscopy and

Capillary Electrophoresis. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 215, n. 1, p. 441–447, mai. 2011.

[120] FLOR, S.; LUCANGIOLI, S.; CONTIN, M.; TRIPODI, V. Simultaneous determination of nine endogenous steroids in human urine by polymeric-mixed micelle capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 31, n. 19, p. 3305–3313, out. 2010.

[121] PÉREZ, R.L.; ESCANDAR, G.M. Liquid chromatography with diode array detection and multivariate curve resolution for the selective and sensitive quantification of estrogens in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, v. 835, p. 19–28, mai. 2014.

[122] LEVENT, A. Electrochemical determination of melatonin hormone using a boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 21, p. 114–119, jan. 2012.

[123] LIN, X.; LI, Y. A sensitive determination of estrogens with a Pt nano-clusters/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 2, p. 253–259, ago. 2006.

[124] BROCENSCHI, R.F.; ROCHA-FILHO, R.C.; DURAN, B.; SWAIN, G.M. The analysis of estrogenic compounds by flow injection analysis with amperometric detection using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 126, p. 12–19, ago. 2014.

[125] TERUI, N.; FUGETSU, B.; TANAKA, S. Voltammetric behavior and determination of 17 beta-estradiol at multi-wall carbon nanotube-Nafion modified glassy carbon electrode. **Analytical sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 895–898, jun. 2006.

[126] CINCOTTO, F.H.; CANEVARIC, T.C.; MACHADO, S.A.S.; SÁNCHEZ, A.; BARRIO, M.A.R.; VILLALONGA, R.; PINGARRÓN, J.M. Reduced graphene oxide-Sb₂O₅ hybrid nanomaterial for the design of a laccase-based amperometric biosensor for estriol. *Electrochimica Acta*, v. 174, p. 332–339, jun. 2015.

[127] EUROPEAN PHARMACOPOEIA, EDQM – European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, 5th Edition, 2004.

[128] PAPI, M. A. P. **CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ELETRODO MODIFICADO COM NANOCOMPÓSITO PRATA-POLIPIRROL PARA A DETERMINAÇÃO DE GLICOSE**. Dissertação de Mestrado (Química). Universidade Federal do Paraná, 2014.

[129] SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. Spectrometric Identification of Organic Compounds, 7th Edition. Wiley, 2005.

[130] LIU, L.; QIN, Y.; GUO, Z.; ZHU, D. Reduction of solubilized multi-walled carbon nanotubes. **Carbon**, v. 41, n. 2, p. 331–335, fev. 2003.

- [131] GÓMEZ, S.; RENDTORFF, N.M.; AGLIETTI, E.F.; SAKKA, Y.; SUÁREZ, G. Surface modification of multiwall carbon nanotubes by sulfonitric treatment. **Applied Surface Science**, v. 379, p. 264–269, ago.2016.
- [132] WHITE, C.M.; BANKS, R.; HAMERTON, I.; WATTS, J.F. Characterisation of commercially CVD grown multi-walled carbon nanotubes for paint applications. **Progress in Organic Coatings**, v. 90, p. 44–53, jan. 2016.
- [133] VEGA, D.; AGÜÍ, L.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J.M. Electrochemical detection of phenolic estrogenic compounds at carbon nanotube-modified electrodes. **Talanta**, v. 71, n. 3, p. 1031–1038, fev. 2007.
- [134] MUSAMEH, M.; WANG, J.; MERKOCI, A.; LIN, Y. Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 4, n. 10, p. 743–746, out. 2002.
- [135] WANG, J.; DEO, R.P.; MUSAMEH, M. Stable and Sensitive Electrochemical Detection of Phenolic Compounds at Carbon Nanotube Modified Glassy Carbon Electrodes. **Electroanalysis**, v. 15, n. 23–24, p. 1830–1834, dez. 2003.
- [136] WANG, J.; HOCEVAR, S.B.; OGOREVC, B. Carbon nanotube-modified glassy carbon electrode for adsorptive stripping voltammetric detection of ultratrace levels of 2,4,6 - trinitrotoluene. **Electrochemistry Communications**, v. 6, n. 2, p. 176–179, fev. 2004.
- [137] WANG, Y.; HE, Q.; DONG, Y.; CHEN, H. In-channel modification of biosensor electrodes integrated on a polycarbonate microfluidic chip for micro flow-injection amperometric determination of glucose. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 145, n. 1, p. 553–560, mar. 2010.